



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Evaluación de seroconversión de anticuerpos
neutralizantes mediante neutralización por reducción
de placas en personas vacunadas contra fiebre amarilla
en zona no endémica**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga**

AUTOR

Karla Verónica VÁSQUEZ CAJACHAHUA

ASESOR

Enrique Walter MAMANI ZAPANA

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Vásquez K. Evaluación de seroconversión de anticuerpos neutralizantes mediante neutralización por reducción de placas en personas vacunadas contra fiebre amarilla en zona no endémica [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología; 2018.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 14:40 horas del 19 de diciembre de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga de **KARLA VERÓNICA VÁSQUEZ CAJACHAHUA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 018-EPMP-2018, el titulando expuso su tesis: **“EVALUACIÓN DE SEROCONVERSIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES MEDIANTE NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DE PLACAS EN PERSONAS VACUNADAS CONTRA FIEBRE AMARILLA EN ZONA NO ENDÉMICA”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: aprobado con mención honrosa.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **KARLA VERÓNICA VÁSQUEZ CAJACHAHUA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 15:45 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 19 de diciembre de 2018.

Mg. DEBORA ALVARADO IPARRAGUIRRE
(PRESIDENTA)

Dr. ENRIQUE MAMANI ZAPANA
(ASESOR)

Dr. JUAN JIMENEZ CHUNGA
(MIEMBRO)

Blgo. MIGUEL TALLEDO RIVERA
(MIEMBRO)

Esta tesis fue llevada a cabo en el laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos gracias al soporte económico brindado por INNOVATE PERÚ.

A mi madre Magna,
por todo su amor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, quien con su gracia y amor ha guiado mi vida, permitiéndome alcanzar los propósitos que tiene planeados para mí.

A mi padre Carlos Vásquez, por sus consejos, apoyo y paciencia.

A mi madre Magna Cajachahua, por acompañarme fielmente en cada momento de mi vida, por compartir mis sueños y anhelos, por darme su apoyo incondicional, por enseñarme sobre fortaleza, por sus consejos sabios, por su amor y dulzura, por su paciencia, por su dedicación y porque representa todo para mí.

A mis profesores Enrique Mamani y Egma Mayta, por haber apostado por mí al brindarme la oportunidad de realizar tesis en su laboratorio, donde desarrollé mis aptitudes como investigadora; por todas sus enseñanzas, por sus consejos valiosos y por todos los buenos momentos compartidos.

A Juan Sulca, por haberme enseñado todas las artes del cultivo de células, por ser partícipe de mi desarrollo científico en el campo de la virología, por ser mi mentor y guía de investigación, por su tiempo invertido, por su paciencia, por sus consejos, por su amistad y por su vocación de enseñanza.

A mis compañeros tesisistas del laboratorio S-6, por los gratos e inolvidables momentos compartidos: Lucas Sevilla, Bernardo Quispe, Adrián Quintana y Gloria Flores.

A mis amigos y compañeros, por animarme y apoyarme con la realización de mi tesis: Oliver Matias, Laura Gutiérrez, Carolina Quispe, Rebeca Sota, José Vilela, Alys Mercedes, Nicole Pereira, Joe Hermosilla, Patrick Gonzales, Angie Marthans, e ingresantes 2015 de la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología.

A todas las personas que han formado parte importante de mi vida y que no he mencionado, gracias por los momentos inolvidables compartidos, gracias por las vivencias, gracias por las enseñanzas y gracias por el afecto.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

TABLA DE CONTENIDO	vi
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
ABREVIATURAS	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL	3
2.1.Fiebre Amarilla	3
2.2.Agente infeccioso	3
2.2.1. Estructura	4
2.2.2. Replicación	5
2.2.3. Variación genética	5
2.3.Epidemiología	6
2.3.1. Ecología y ciclos de transmisión	6
2.3.2. Reservorios y vectores	8
2.3.3. Distribución geográfica e incidencia	10
2.3.4. Factores asociados a eventos epidemiológicos	13
2.4.Respuesta inmunológica	14
2.4.1. Innata	14
2.4.2. Adaptativa	15
2.5.Prevenición y control	16
2.5.1. Vacunas	16

2.5.2. Cepa 17D	16
2.5.3. Dosis de vacunación y rutas de administración.	18
2.5.4. Revacunación.....	18
2.6.Seroconversión	18
2.7.Evaluación de la seroconversión	19
2.7.1. PRNT	19
2.8.Correlato de protección	22
2.9.Fallas en la seroconversión.....	23
2.10. Importancia y beneficios de la vacunación.....	24
III. HIPOTESIS DE INVESTIGACIÓN	25
IV. OBJETIVOS	25
4.1.Objetivo general.....	25
4.2.Objetivos específicos	25
V. MATERIAL Y MÉTODOS	26
5.1.Diseño de la investigación.....	26
5.2.Muestra	26
5.2.1. Criterios de selección	26
5.2.2. Consentimiento informado	27
5.3.Obtención de muestras de sueros.....	27
5.4.Establecimiento de un sistema de cultivos celulares con la línea celular Vero-76.	28
5.5.Producción de semillas virales.	29

5.6.Titulación de semilla viral en células Vero-76. Método de recubrimiento semisólido.....	29
5.7.Determinación del título de anticuerpos neutralizantes, de personas sanas vacunadas contra FA, mediante la prueba de PRNT ₈₀	31
5.8.Análisis estadístico.....	34
VI. RESULTADOS	35
6.1.Títulos de anticuerpos neutralizantes de personas sanas vacunadas contra FA, determinados mediante PRNT ₈₀	35
6.2.Diferencias de los títulos de anticuerpos neutralizantes con relación al tiempo posvacunación, sexo y edad.....	40
VII. DISCUSIÓN.....	43
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. RECOMENDACIONES.....	50
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
XI. ANEXOS	69
Anexo 1. Formato del Consentimiento Informado.....	69
Anexo 2. Composición de los medios de cultivo y soluciones empleados	72
Anexo 3. Efecto citopático y titulación del Pasaje 3 de semillas virales en células Vero-76.....	75
Anexo 4. Ficha Epidemiológica	76
Anexo 5. Flujogramas.	77
Anexo 6. Fotografías	79
Anexo 7. Ecuaciones empleadas para realizar la prueba de PRNT.....	86

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
Tabla 1. Características demográficas de los participantes.	35
Tabla 2. Características y títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla de los participantes en los días 10 y 40 posvacunación.	36
Tabla 3. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre amarilla obtenidos por el control positivo y negativo de las pruebas PRNT ₈₀ realizadas para evaluación de seroconversión.	38
Tabla 4. Títulos virales obtenidos por el control de virus en las pruebas de PRNT ₈₀ realizadas para evaluación de seroconversión.	38
Tabla 5. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla obtenidos de la evaluación de 6 puntos de corte del PRNT en el día 10 posvacunación.	39
Tabla 6. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla obtenidos de la evaluación de 6 puntos de corte del PRNT en el día 40 posvacunación.	39
Tabla 7. Características demográficas y títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla obtenidos por la persona que no mostró incremento en la seroconversión en el día 10 posvacunación.	40
Tabla 8. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra FA alcanzados por varones y mujeres en el día 10 y 40 posvacunación.	41
Tabla 9. Título del Pasaje 3 de semillas virales mediante prueba de plaqueo por método semisólido.	75

Figura 1. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla obtenidos con el método clásico y el método de regresión lineal. (A) Títulos alcanzados en el día 10 posvacunación. (B) Títulos alcanzados en el día 40 posvacunación.....	37
Figura 2. Curva de seroconversión de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla, medidos mediante PRNT ₈₀ , en los 2 momentos de evaluación.	40
Figura 3. Distribución de títulos de anticuerpos neutralizantes, obtenidos mediante regresión lineal, según sexo. (A) Distribución del título de anticuerpos neutralizantes al día 10 posvacunación. (B) Distribución del título de anticuerpos neutralizantes al día 40 posvacunación.....	41
Figura 4. Gráfico de dispersión de Títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla, y la edad de los varones en el día 40 posvacunación.	42

RESUMEN

La fiebre amarilla es una enfermedad viral que se mantiene endémica en regiones tropicales de África y América. Desde el brote ocurrido en el 2016 en Perú, la principal estrategia del estado frente a la amenaza de esta enfermedad ha sido la vacunación. Investigaciones previas señalan la efectividad de la vacuna antiamarílica, sin embargo, no se cuenta con investigaciones que evalúen la protección conferida a población peruana. El objetivo de esta investigación fue evaluar la seroconversión de anticuerpos neutralizantes, mediante la prueba de neutralización por reducción de placas, en personas vacunadas contra la fiebre amarilla en zona no endémica. Mediante un muestreo no probabilístico se seleccionaron 30 personas, en aparente estado de inmunocompetencia, que fueron evaluadas a 10 y 40 días posvacunación contra la fiebre amarilla mediante la prueba de neutralización por reducción de placas. Se halló que, en el día 10 posvacunación, el 100% de los participantes presentó seroconversión con títulos de anticuerpos neutralizantes mayor o igual a 1:10, de los cuales, el 96,7% mostró seroconversión con incremento mayor al cuádruple de anticuerpos neutralizantes contra esta enfermedad. En el día 40 posvacunación el 100% de los participantes presentó seroconversión respecto al título de anticuerpos neutralizantes de la muestra obtenida previa vacunación contra la fiebre amarilla. Se halló que el menor título de anticuerpos neutralizantes obtenido fue 1:14, en el día 10 posvacunación, y el mayor título 1:32 750, en el día 40 posvacunación. Los títulos de anticuerpos neutralizantes en el día 40 posvacunación, presentaron significancia estadística con relación al sexo.

Palabras clave: Fiebre amarilla, vacunación, seroconversión, PRNT, Perú.

ABSTRACT

Yellow fever is an endemic viral disease in tropical regions of Africa and America. Since the outbreak of 2016 in Peru, the main strategy of the government against the threat of this disease has been vaccination. Previous research have shown the effectiveness of the yellow fever vaccine, however there is no research regarding the protection conferred by the vaccine in the Peruvian population. The aim of this study was to evaluate the seroconversion of neutralizing antibodies by the method of plaque reduction neutralization test (PRNT) in people vaccinated against yellow fever in non-endemic area. Through a non-probabilistic sampling, 30 people in an apparent state of immunocompetence were selected, they were evaluated at 10 and 40 days post-vaccination against yellow fever by plaque reduction neutralization test. It was found that on day 10 post-vaccination, 100% of the participants presented seroconversion with neutralizing antibody titers greater than or equal to 1:10 of which, 96.7% showed seroconversion with more than four-fold increase in neutralizing antibodies against this disease. On day 40 post-vaccination, 100% of the participants presented seroconversion with respect to the neutralizing antibody titer of the sample obtained before vaccination against yellow fever. It was found that the lowest neutralizing antibody titer obtained was 1:14, on day 10 post-vaccination, and the highest titer 1:32 750 on day 40 post-vaccination. Neutralizing antibody titers on day 40 post-vaccination had statistical significance in relation to gender.

Key words: Yellow fever, vaccination, seroconversion, PRNT, Peru.

ABREVIATURAS

ALV	: del inglés “Avian Leukosis Virus”
ARN	: Ácido Ribonucleico
C	: Proteína de Cápside
CDC	: del inglés “Centers for Disease Control and Prevention”
CMC	: Carboximetilcelulosa
DGE	: Dirección General de Epidemiología
E	: Proteína de Envoltura
ECDC	: del inglés “European Centre for Disease Prevention and Control”
ECP	: Efecto Citopático
ELISA	: del inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”
E-MEM	: del inglés “Earle’s Minimum Essential Medium”
FA	: Fiebre Amarilla
FNT	: Factor de necrosis tumoral
IC 95%	: Intervalo de confianza del 95%
IL	: Interleucina
ILN	: Índice Logarítmico de Neutralización
INEI	: Instituto Nacional de Estadística e Informática
INF	: Interferón
INS	: Instituto Nacional de Salud
IPK	: Instituto Pedro Kourí
M	: Proteína de Membrana
MC	: Medio de Crecimiento
MG	: Media Geométrica
MINSA	: Ministerio de Salud
MM	: Medio de Mantenimiento
NBB	: del inglés “Naphtol Blue Black”

NK	: del inglés “Natural Killer”
NS	: Proteína No Estructural
OMS	: Organización Mundial de la Salud
OPS	: Organización Panamericana de la Salud
ORF	: del inglés “Open Reading Frame”
P3	: Pasaje 3 de la semilla viral
PAHO	: del inglés “Pan American Health Organization”
PrM	: Proteína de pre-Membrana
PRNT	: del inglés “Plaque Reduction Neutralization Test”
RSI	: Reglamento Sanitario Internacional
RT-PCR	: del inglés “Reverse Transcriptasa - Polymerasa Chain Reaction”
SBF	: Suero Bovino Fetal
SVS	: Secretaria de Vigilancia en Salud
Th-1	: del inglés “T helper 1”
TLR	: del inglés “Toll Like Receptor”
UFP	: Unidad Formadora de Placa
VIH	: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
WHO	: del inglés “World Health Organization”
YEL-AND	: del inglés “Yellow Fever Vaccine - Associated Neurotropic Disease”
YEL-AVD	: del inglés “Yellow Fever Vaccine - Associated Viscerotropic Disease”

I. INTRODUCCIÓN

La Fiebre Amarilla (FA), es una enfermedad viral transmitida por la picadura de mosquitos hematófagos, que se desarrolla desde formas asintomáticas hasta formas graves, y que puede alcanzar tasas de letalidad del 50% (Monath, 2001; Quaresma, *et al.*, 2013). La enfermedad es endémica en aproximadamente 47 países de África y América (WHO, 2013; Gershman & Staples, 2017), siendo el Perú uno de los países afectados, con 12 departamentos endémicos para esta enfermedad (Espinoza, *et al.*, 2005; Jentes, *et al.*, 2011).

En el 2016 aconteció el último brote de FA en Sudamérica, reportándose en el Perú más de 60 casos de fiebre amarilla selvática (cifra mucho mayor a las reportadas en los 9 años anteriores) (DGE, 2018). El cambio climático, el incremento de movilizaciones humanas a zonas endémicas, y la basta distribución de *Aedes aegypti* (vector del ciclo de transmisión urbano) en zonas endémicas y no endémicas, nos mantiene propensos a la emergencia y reemergencia de esta enfermedad (Vasconcelos, *et al.*, 2001; Espinoza, *et al.*, 2005; Gould & Higgs, 2009; Monath & Vasconcelos, 2015) que actualmente solo se presenta en ciclos de transmisión selváticos, pero que tiene el potencial de presentarse en ciclos urbanos con mayor repercusión epidemiológica, que podría afectar a residentes de zonas endémicas y no endémicas del país y propagarse en radios geográficos más amplios.

Al no existir tratamiento antiviral específico, la principal medida de los organismos internacionales y del estado peruano, para el control de la enfermedad, ha sido reforzar la estrategia de vacunaciones (Monath, 2001; Monath, 2005; Barnett, 2007; Jentes, *et al.*, 2011; WHO, 2013; Monath & Vasconcelos, 2015), además de establecer sistemas de vigilancia sindrómica y control vectorial; de este modo, desde el año 2000 se dispuso una vacuna gratuita para residentes y viajeros de zonas endémicas, y desde el 2009 se la incluyó en el esquema nacional de vacunaciones para niños de 15

meses de edad residentes de zonas endémicas y no endémicas de todo el país (MINSA, 2011). Teniendo en cuenta que la protección de la población peruana frente a esta enfermedad depende principalmente del éxito de las vacunaciones, se remarca la importancia de contar con datos que respalden la efectividad de esta estrategia, considerando la realidad social y epidemiológica de nuestra población, que podría verse afectada por deficiencias en la cobertura de vacunación o por fallas en la seroconversión regidas por características propias de la población peruana.

La información disponible sobre cobertura de vacunación y seroconversión de anticuerpos neutralizantes contra FA en población peruana es escasa. Se sabe que la cobertura de vacunación en niños menores de 5 años es de 59,9% (DGIESP, 2018), sin embargo, no se cuenta con información sobre la cobertura de vacunación en el resto de la población, que es la población económicamente activa comprendida entre los 18 y 29 años, y que es la más afectada por la enfermedad (DGE, 2018); del mismo modo, la información disponible sobre seroconversión de anticuerpos neutralizantes en población peruana muestra la evaluación de niños residentes de una zona no endémica (Sullana, Piura), vacunados contra la FA como parte de la evaluación de las vacunas Arilvax y YF-VAX (Belmusto-Worn, *et al.*, 2005), mas no se cuenta con información disponible sobre el resto de la población, que como ya se explicó, incluye a la población en riesgo de contraer la enfermedad.

A fin de suplir información al respecto, el objetivo de la presente investigación fue obtener datos actuales sobre el estado serológico tras la vacunación contra la FA, evaluando, de forma exploratoria, la seroconversión de una población económicamente activa, sana, en aparente estado de inmunocompetencia, y residente de zonas no endémicas para la enfermedad, mediante la prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT, por sus siglas en inglés), que es el “estándar de oro” para la detección de anticuerpos neutralizantes, por ser una prueba altamente específica y sensible.

II. MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL

2.1. Fiebre Amarilla

Es una enfermedad viral, febril y hemorrágica, transmitida por mosquitos, endémica y epidémica en 47 países de África y América. A pesar de la disponibilidad de vacunas, altamente efectivas, sigue afectando a la salud pública de la población mundial (WHO, 2013; Chowdhury, *et al.*, 2015), siendo considerada una de las arbovirosis más importantes en nuestro país, con alto potencial de dispersión y riesgo de urbanización (Belmusto-Worn, *et al.*, 2005).

El espectro clínico de la enfermedad de FA es amplio; puede manifestarse como una enfermedad subclínica, una enfermedad abortiva con síntomas inespecíficos o una enfermedad sistémica potencialmente letal que tiene una tasa de letalidad de 20 - 60% (Chen & Hamer, 2017), lo cual causa complicaciones de diagnóstico que generan la subestimación de morbilidad e inflación de tasas de letalidad al considerar solo casos de FA sistémica (Barnett, 2007; Staples & Monath, 2011; Monath, *et al.*, 2013; Barrett, 2017). El periodo de incubación de FA en el hombre es de 2 - 9 días (periodo intrínseco de incubación).

Después de la picadura infectante, el virus que ingresa al tejido subcutáneo es reconocido por células dendríticas y presentado en los nódulos linfáticos a los linfocitos T CD4+, diseminándose por vía linfática a otros órganos (hígado y bazo) donde se replica intensamente produciendo la viremia y con ella la diseminación a otros tejidos (Quaresma, *et al.*, 2013).

2.2. Agente infeccioso

El agente causal es el virus FA, prototipo del género *Flavivirus* de familia *Flaviviridae* que incluye aproximadamente 70 virus agrupados en base a características serológicas y moleculares, la mayoría de los cuales son transmitidos por artrópodos (Calisher, *et al.*, 1989; Monath, 2001; Espinoza, *et al.*, 2005). El virus salvaje es capaz

de causar una enfermedad viral sistémica con viremia de hasta 10^9 unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml).

2.2.1. Estructura

Es un virus icosaédrico de 50 nm de diámetro, con genoma ARN de 10 Kb, cadena simple y sentido positivo. Posee un solo marco de lectura abierto (ORF) que contiene 3 genes codificantes de proteínas estructurales (C, prM/M y E) y 7 genes codificantes de proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), los cuales son traducidos en una única poliproteína viral.

La proteína E, llamada proteína de envoltura, tiene mayor relevancia inmunológica por encontrarse anclada a la superficie de la envoltura viral y ser responsable de fases iniciales de la invasión celular (adhesión y fusión viral). Las proteínas NS1 y NS3 se expresan en membranas de células infectadas y contribuyen a la lisis celular mediada por complemento y por células T citotóxicas (respectivamente). Las proteínas NS1, NS2A, NS4A y NS4B están involucradas en la replicación del ARN viral. Las proteínas NS2B y NS3 cumplen, en conjunto, funciones de serina proteasa (responsable de la escisión postraducciona l de la poliproteína viral), ARN helicasa y ARN trifosfatasa, necesarios para la replicación viral. La proteína NS5 tiene función de ARN polimerasa dependiente de ARN.

El genoma viral también contiene regiones no codificantes (5' y 3') esenciales para la replicación del virus, y sugestivamente, determinantes de la infectividad viral en diversas especies de mosquitos (Monath, 2001; Bae, *et al.*, 2003; Bryant & Barrett, 2003; Staples & Monath, 2011; Beck & Barrett, 2015; Monath & Vasconcelos, 2015).

2.2.2. Replicación

Después de la liberación de la nucleocápside en el citoplasma, el ARN se traduce inmediatamente, para sintetizar ARN polimerasa dependiente ARN, ARN helicasa y ARN trifosfatasa, que replican cadenas de ARN negativas de longitud completa. Estas cadenas negativas sirven como plantillas para cadenas positivas de ARN, que son ensambladas en viriones en el retículo endoplásmico y liberadas por exocitosis (Staples & Monath, 2011).

2.2.3. Variación genética

La estabilidad genética de los virus transmitidos por artrópodos es alta y sus tasas de mutaciones adquiridas son menores en comparación con otros virus de ARN (Jenkins, *et al.*, 2002; Staples & Monath, 2011). El virus de FA no es ajeno a estas características, lo cual resulta determinante para que una sola cepa vacunal (17D) sea capaz de proteger efectivamente contra la enfermedad (Monath, 2005; Gershman & Staples, 2017). La alta estabilidad genética de estos virus se atribuye al ciclo alterno que tienen entre hospedadores artrópodos y vertebrados, lo cual limita la evolución debido a que las mutaciones que aumentan la aptitud infecciosa sobre un hospedador disminuyen la aptitud infecciosa sobre el hospedador posterior (Holmes & Twiddy, 2003; Coffey, *et al.*, 2008; Staples & Monath, 2011). La estabilidad genética también ha sido asociada a los cuellos de botella que enfrentan estos virus dentro de los vectores (Forrester, *et al.*, 2012) y de los hospedadores vertebrados (Erickson & Pfeiffer, 2013).

Análisis filogenéticos realizados, evaluando la región no codificante 3' y las regiones codificantes de proteínas estructurales y no estructurales (prM/M, E, NS4A, NS4B y NS5) del virus de FA, sugieren que las cepas salvajes que circulan actualmente tuvieron origen en África oriental (hace 1500 años), desde donde divergieron en genotipos africanos occidentales, para luego introducirse a América

(hace aproximadamente 470 años), y divergir en genotipos sudamericanos (Bryant, *et al.*, 2007).

Las cepas salvajes del virus de FA pertenecen a 7 genotipos distribuidos entre África y Sudamérica (Monath, 2001), que no difieren en cuanto a manifestaciones clínicas causadas por la enfermedad, y que están agrupados en un único serotipo (Bryant & Barrett, 2003). Se han descrito cinco genotipos entre las cepas africanas: genotipo África I y II, genotipo África oriental/central, genotipo África oriental y genotipo Angola (Staples & Monath, 2011), y dos genotipos entre las cepas sudamericanas: genotipo I (Brasil, Bolivia, Colombia, Ecuador, Panamá, Venezuela y Trinidad) y genotipo II (Perú, Bolivia y occidente de Brasil) (Monath, 2001; Bryant & Barrett, 2003; Bryant, *et al.*, 2007; Staples & Monath, 2011).

2.3. Epidemiología

2.3.1. Ecología y ciclos de transmisión

En base a su ecología, el virus de FA es denominado “arbovirus” (virus transmitido por artrópodos) para denotar el hecho de que es transmitido por mosquitos. La hipótesis más aceptada de la ecología del virus de FA en la naturaleza es su mantención por "epizootias errantes", donde poblaciones de monos se mueven continuamente a lo largo de regiones boscosas y cursos fluviales, manteniendo la infección en ciclos regulares, donde la inmunización natural, muerte y reconstitución de monos susceptibles son factores determinantes para su aparición cíclica (Bryant, *et al.*, 2003; Bryant & Barrett, 2003).

En África se distinguen 3 ciclos de transmisión: ciclo selvático, urbano y de sabana; en América solo se ha identificado ciclos selváticos y urbanos. Ni el virus ni la enfermedad clínica difieren entre estos ciclos, pero la identificación del tipo de ciclo de transmisión es importante para el control de la enfermedad.

Fiebre Amarilla selvática

La FA selvática, es un ciclo de transmisión predominante en selvas ecuatoriales de África y Sudamérica. Se mantiene entre monos por medio de mosquitos que viven en agujeros de árboles (Monath & Vasconcelos, 2015). Los humanos son accidentalmente infectados cuando entran al bosque o cuando monos virémicos salen de ellos e infectan a mosquitos en la franja de los bosques (Barrett & Monath, 2003). Los principales vectores selváticos son mosquitos de los géneros *Aedes* spp. en África y, *Haemagogus* spp. y *Sabethes* spp. en Sudamérica (Barrett & Monath, 2003; Miyaji, *et al.*, 2016; Barrett, 2017; Chen & Hamer, 2017). En la actualidad, la mayoría de los casos humanos reportados corresponden a FA selvática.

Fiebre Amarilla urbana

La FA urbana es un ciclo que implica la transmisión de FA entre humanos en áreas urbanas, y está mediada por *Aedes aegypti*. Los antecedentes de erradicación de este mosquito señalan la desaparición de FA urbana, sin embargo, durante los últimos 30 años la mayoría de los países endémicos (entre ellos Perú) han sido reinfestados y mantienen un alto riesgo de urbanización de la enfermedad (Barrett & Monath, 2003; Monath & Vasconcelos, 2015); esta situación hace que el panorama futuro implique la ocurrencia de grandes brotes de FA urbana, donde un individuo infectado podría conducir a la infección de otros 7 individuos susceptibles (Wu, *et al.*, 2016).

Ciclo de sabana

También llamado ciclo de transmisión intermedio. Se produce en pastizales húmedos que bordean bosques tropicales africanos, donde los mosquitos *Aedes* spp. alcanzan altas densidades en temporadas lluviosas, y transmiten la enfermedad entre humanos y monos (Barrett & Monath, 2003).

2.3.2. Reservorios y vectores

Vectores

Los mosquitos que habitan en los agujeros de los árboles son los principales vectores implicados en la replicación del virus y la transmisión entre hospedadores vertebrados. Los mosquitos hembra se infectan durante su alimentación de hospedadores con viremia, de al menos, 10^4 UFP/mL (Barrett & Monath, 2003). Después de un período de incubación de 7 a 14 días en el mosquito (período extrínseco de incubación), los virus de FA se diseminan hasta las glándulas salivales, desde donde se transmitirán a nuevos hospedadores durante la alimentación (Barrett & Monath, 2003; Staples & Monath, 2011; Monath, *et al.*, 2013). El virus de FA también se puede transmitir transováricamente, permitiendo la supervivencia viral en huevos, en épocas de sequía (principalmente en las especies de los géneros *Aedes* y *Haemagogus*) (Barrett & Monath, 2003; Staples & Monath, 2011).

En África, los principales vectores son *A. africanus* en el ciclo selvático de transmisión, *A. aegypti* en el ciclo urbano de transmisión, y *A. africanus*, *A. bromeliae*, *A. furcifer*, *A. luteocephalus*, *A. metallicus*, *A. opek*, *A. simpsoni*, *A. taylori*, *A. vittatus* y *A. kenysensis* en el ciclo de sabana. En Sudamérica, los principales vectores son *Haemagogus janthinomys* y *Sabethes chloropterus* en el ciclo selvático y *A. aegypti* en el ciclo urbano (Barrett & Monath, 2003).

La eficiencia vectorial es una cualidad importante que deben tener los mosquitos para transmitir de la enfermedad. *A. aegypti* no es considerado un vector de alta eficiencia debido a los porcentajes variables (30 - 80%) de transmisión viral que ejerce sobre animales de experimentación no infectados (Barrett & Monath, 2003) y debido a que durante grandes epidemias ocurridas en Nigeria y Senegal presentó altos porcentajes de resistencia a la infección por virus de FA y bajos

porcentajes de transmisión viral (Miller, *et al.*, 1989); a pesar de no ser un vector eficiente, *A. aegypti* puede mantener transmisiones intensivas durante las epidemias, debido a su antropofilia y adaptabilidad que le permiten alcanzar altas densidades en áreas urbanas (Barrett & Monath, 2003).

También se ha sugerido que la ineficiencia de mosquitos vectores puede favorecer la selección de cepas más virulentas, lo cual aumenta la patogenicidad y gravedad de la enfermedad de FA (Barrett & Monath, 2003). *A. aegypti* es el vector con mayor perjuicio asociado a la enfermedad de FA; en el Perú solo tiene lugar el ciclo de transmisión selvático, por tal motivo este vector no está asociado a la transmisión de FA, sin embargo su amplia distribución geográfica y su resistencia a insecticidas, unido a los saneamientos deficientes y el alto costo del control vectorial, hacen difícil su erradicación e incrementan el riesgo de reemergencia de la FA urbana en el Perú.

Reservorios

Los monos son los únicos hospedadores vertebrados implicados en el ciclo de transmisión de la FA. En general, la viremia es corta (2 - 5 días), aunque puede durar hasta 9 días en monos colobos africanos. Los monos infectados mueren o desarrollan inmunidad protectora de por vida. La mayoría de los monos africanos no desarrollan síntomas de la enfermedad, sin embargo, en Sudamérica muchas especies sí desarrollan infecciones letales (Barrett & Monath, 2003). También se ha encontrado anticuerpos contra el virus de FA en otros vertebrados (perezosos y marsupiales), pero debido a su baja viremia es improbable que sean importantes en ciclos de transmisión viral (Barrett & Monath, 2003).

En África, los principales reservorios son monos de la especie *Colobus abyssinicus*, *Cercopithecus* spp. y *Galago senegalensis*. En Sudamérica, los principales reservorios son monos de los géneros *Alouatta* sp. (mono aullador),

Aotus sp. (mono nocturno), *Saimiri* sp. (mono-ardilla) y *Ateles* sp. (mono-araña/maquisapa); en Perú, las especies del género *Alouatta* sp. son considerados de mayor importancia para la transmisión de FA debido a su alto grado de susceptibilidad al virus, su capacidad de desplazamiento y al tamaño de su población que no es afectada por la caza debido a la poca apetencia de su carne (Barrett & Monath, 2003; Espinoza, *et al.*, 2005).

2.3.3. Distribución geográfica e incidencia

La FA es endémica e intermitentemente epidémica en África (34 países) y América (13 países), siendo África el continente donde se reportan el 90% de los casos mundiales (WHO, 2013; Barrett, 2017; Gershman & Staples, 2017).

Se estima que ocurren 200 000 casos y 30 000 defunciones por año, con una tasa de letalidad de 20% en África y 40 - 60% en Sudamérica (WHO, 2013; Monath & Vasconcelos, 2015), sin contar los casos no reportados por infecciones asintomáticas (que podrían llegar a representar el 55% de las infecciones por FA (Johansson, *et al.*, 2014)) o por deficiencias de sistemas de vigilancia y diagnóstico (Barnett, 2007; CDC, 2010; WHO, 2013).

Las epidemias de FA se controlaron eficazmente en las décadas de 1950 y 1960 mediante el control vectorial, los programas de vacunación y la aplicación del Reglamento Sanitario Internacional (RSI), que solicita a los viajeros mostrar evidencia de vacunación contra la FA antes de cruzar las fronteras de países con zonas endémicas para esta enfermedad (Barrett, 1997; Barnett, 2007). Sin embargo, el paso del tiempo resultó en la aplicación menos estricta de estas medidas, que unido al cambio climático y al cambio global en las movilizaciones humanas han dado como resultado mayor incidencia de brotes epidémicos en el mundo.

Como parte de esta realidad, se muestra el incremento de los reportes de casos de viajeros no vacunados infectados en zonas endémicas: 10 casos confirmados en los tres primeros meses del 2018 (viajeros que adquirieron FA en Brasil), que supera con creces el número de casos registrados en todo el mundo en los últimos 27 años (ECDC, 2017; Hamer, *et al.*, 2018). Esta situación agrava el riesgo de dispersión de FA a continentes no endémicos como Asia, donde la población susceptible vive en áreas con circulación de *Aedes aegypti* (vector en la transmisión de FA urbana) y donde la transmisión viral de FA se podría dar de forma adecuada (WHO, 2016; Barrett, 2017; Wilder-Smith & Leong, 2017; Brent, *et al.*, 2018; Gubler, 2018; Hamer, *et al.*, 2018).

Fiebre Amarilla en África

A pesar de la administración de la vacuna contra FA desde 1940, deficiencias de su cobertura en países endémicos, disminución de la inmunidad poblacional e incremento de la densidad de vectores, han propiciado la reemergencia de FA en África (Barnett, 2007; CDC, 2010; Grobbelaar, *et al.*, 2016).

Desde el año 2011 hasta el año 2016, se reportaron brotes en la República Democrática del Congo, Sudán, Camerún, Chad, Senegal, Côte d'Ivoire, Angola, Uganda y Sierra Leona (Grobbelaar, *et al.*, 2016; WHO, 2016). En el 2016 ocurrió el último brote de FA en África, y afectó mayormente a los países de Angola y a la R. D. del Congo. En Angola (hasta el 8 de julio del 2016) se reportaron un total de 3 625 casos sospechosos, 876 casos confirmados y 357 defunciones, y en la R.D. del Congo (hasta el 11 de julio del 2016) se reportaron 1 798 casos sospechosos, 68 casos confirmados (59 importados, 2 selváticos no relacionados al brote y 7 autóctonos) y 85 defunciones (Grobbelaar, *et al.*, 2016; WHO, 2016). El control de este brote requirió de la administración de dosis fraccionadas de la vacuna contra la FA, a fin de garantizar la cobertura de la población vulnerable ante la

disponibilidad reducida de vacunas contra esta enfermedad (Chen & Hamer, 2017; Wu, *et al.*, 2016).

Fiebre amarilla en América

Tras el brote epidémico ocurrido en 1995, se impulsaron campañas masivas de vacunación y la incorporación de la vacuna en el esquema de inmunización infantil de las regiones endémicas, sin embargo, la falta de acceso a áreas epidémicas y la migración de individuos susceptibles a regiones boscosas con transmisión epizootica hacen persistir los casos de FA (Espinoza, *et al.*, 2005; Barnett, 2007; CDC, 2010; Jentes, *et al.*, 2011).

Entre enero del 2016 y marzo del 2018 siete países reportaron casos humanos confirmados de FA: Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Perú y Surinam. La cantidad de casos humanos y epizootias reportadas en este período fue la más alta observada en décadas (PAHO, 2017; PAHO, 2018).

Fiebre Amarilla en el Perú

La FA es endémica tradicionalmente en las cuencas hidrográficas, donde el virus se mantiene en libre circulación. La mayor incidencia de casos se da en la selva alta (rupa-rupa), en áreas ubicadas debajo de los 2300 msnm. Los departamentos endémicos durante el periodo 2011 - 2017 fueron Loreto, Junín, Madre de Dios, San Martín, Ucayali, Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Pasco y Puno (Espinoza, *et al.*, 2005; Jentes, *et al.*, 2011; DGIE, 2017; DGE, 2017).

La última epidemia de FA urbana ocurrida en el Perú se inició en 1919, en Piura, y se extendió hasta 1921 (Espinoza, *et al.*, 2005); desde entonces no se reportan casos de FA urbana, sin embargo, el riesgo de urbanización permanece por la presencia del vector y las condiciones sociales de las comunidades vulnerables.

El primer brote reconocido de FA selvática ocurrió en Junín en 1925, y en el año 1995 se produjo la epidemia más importante para Perú en los últimos 60 años (489 casos humanos confirmados y probables), siendo Junín el departamento con mayor incidencia de casos (159); los siguientes brotes epidémicos relevantes ocurrieron en los años 1998, 2004, 2005 y 2006 (DGE, 2017). El último brote epidémico de FA selvática se registró en el 2016, con 61 casos confirmados reportados. En el 2017 se reportaron 10 casos confirmados, y hasta la semana 34 del presente año se han reportado 13 casos (8 confirmados y 5 probables), que indican la persistencia de FA selvática en nuestra región (DGE, 2018).

2.3.4. Factores asociados a eventos epidemiológicos

Muchos de los factores determinantes para el desarrollo de epidemias emergentes incluyen: niveles de desarrollo socioeconómico, viajes y migraciones humanas, comercio, urbanización, deforestación, proyectos de riego y agricultura, aumento de la densidad de poblaciones de humanos, animales y artrópodos, y actividades político-militares que conducen a evacuaciones humanas masivas; sin embargo, son las fluctuaciones climáticas las que han tenido mayor impacto transitorio en determinadas epidemias de arbovirus (Gould & Higgs, 2009; Monath & Vasconcelos, 2015).

Clima

Es un factor importante para determinar la distribución geográfica y temporal de los artrópodos y las características de sus ciclos de vida, y en consecuencia los patrones de dispersión de los virus asociados, la evolución de los éstos y la eficiencia con la que se transmiten de artrópodos a hospedadores vertebrados.

El incremento de la temperatura, humedad y precipitaciones, ocasionadas por el calentamiento global y la alteración de los ciclos naturales que estabilizan el clima (como el fenómeno del Niño), favorecen la reducción de los períodos de

incubación del virus en los artrópodos vectores, trayendo como consecuencia el incremento de la transmisión de las enfermedades como la FA (Barrett & Monath, 2003; Gould & Higgs, 2009; Staples & Monath, 2011); por tanto, al ser los artrópodos los componentes críticos del ciclo de transmisión y al mismo tiempo ser dependientes de las condiciones climáticas, es posible afirmar que las enfermedades virales transmitidas por artrópodos (como la FA) están generando brotes epidémicos a consecuencia del cambio climático globalizado, y de continuar así, se espera que los principales mosquitos vectores involucrados (como *Aedes* sp.) se dispersen más allá de sus límites geográficos actuales, causando la emergencia de enfermedades arbovirales en nuevas regiones (Gould & Higgs, 2009; Gubler, 2018).

2.4. Respuesta inmunológica

2.4.1. Innata

Es la primera línea de defensa del huésped. Involucra la respuesta de células *Natural Killer* (NK) y otros factores de resistencia, que interfieren con la replicación del virus antes de la aparición de anticuerpos y células T citotóxicas.

Los interferones (IFN) activan varios mecanismos de defensa del huésped, incluyendo el aumento de células NK, monocitos/macrófagos portadores de CD14, proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I en la superficie de la célula huésped, síntesis de inmunoglobulina dependiente de linfocitos T *helper* 1 (Th1) y actividad de linfocitos T citotóxicos. Además de los IFN, se han encontrado otras citoquinas proinflamatorias y marcadores de activación de células T durante el período virémico, después de la vacunación contra la FA en humanos, incluidos TNF- α , IL-1, neopterina, β 2-microglobulina y células T CD8+ circulantes (Barrett & Teuwen, 2009; Pulendran, 2009).

También se activan múltiples receptores tipo Toll (TLR2, 7, 8 y 9) que provocan respuestas de citoquinas proinflamatorias que impulsan fuertemente la respuesta inmunológica adaptativa. Por esta y otras razones, se cree que la activación inmunológica innata desempeña un rol determinante para la respuesta inmunológica adaptativa observada tras la infección natural o tras la vacunación contra la FA (Pulendran, 2009; Barrett & Teuwen, 2009; Staples & Monath, 2011).

2.4.2. Adaptativa

Los anticuerpos IgM se detectan entre los 3 - 7 días después del inicio de síntomas, alcanzan sus niveles máximos dos semanas después y luego disminuyen, pudiendo persistir en niveles bajos hasta 18 meses (Pulendran, 2009; Barrett & Teuwen, 2009); sin embargo existen reportes que indican que los anticuerpos IgM pueden mantenerse en niveles detectables hasta cuatro años después del evento infeccioso (Gibney, *et al.*, 2012).

La respuesta de anticuerpos neutralizantes se detecta aproximadamente a 7 días después del inicio de síntomas, y alcanzan sus niveles máximos entre 4 - 6 semanas posteriores (Pulendran, 2009); estos anticuerpos pueden permanecer en niveles detectables hasta 35 - 45 años después del evento infeccioso (Poland, *et al.*, 1981; Pulendran, 2009). Los anticuerpos neutralizantes son los principales mediadores de la protección frente a las re exposiciones.

La respuesta inmunológica adaptativa celular es un mecanismo importante de protección contra la infección, ya que se reconocen epítomos más conservados que no cambian debido a la presión selectiva por anticuerpos, por tanto son un mecanismo determinante frente a las infecciones por cepas virales salvajes (Hill, *et al.*, 1992). La activación de las células T citotóxicas, CD4+ y CD8+, responde a las proteínas no estructurales NS1, NS2B, NS3 y a la proteína estructural E de los viriones. La respuesta de células T CD8+ se desarrolla rápidamente después del

inicio de síntomas, alcanza su nivel máximo el día 15 (con aproximadamente 15% de células T CD8+ activadas) y disminuyen a niveles basales en el día 30 después del inicio de síntomas; éstas células contribuyen a la respuesta inmunológica mediante el aclaramiento viral por lisis de células infectadas (Barrett & Teuwen, 2009; Pulendran, 2009; Staples & Monath, 2011; Monath, *et al.*, 2013)..

2.5. Prevención y control

La forma primaria de prevenir la enfermedad de FA es evitando las picaduras por mosquitos en zonas endémicas (Gershman & Staples, 2017), sin embargo, la forma más efectiva de proteger a personas que viven en áreas sujetas a la enfermedad epidémica, proteger a viajeros que visitan éstas áreas y prevenir la propagación internacional (minimizando el riesgo de la importación del virus por viajeros virémicos), es la vacunación contra la FA (Bryant, *et al.*, 2003; WHO, 2013; Barrett & Teuwen, 2009; Barrett, 2017; Gershman & Staples, 2017; PAHO, 2018).

2.5.1. Vacunas

La vacuna contra la FA es altamente efectiva y segura, y proporciona inmunidad efectiva al 80 - 100% de los vacunados a 10 días posvacunación, y al 99% de los vacunados a 30 días posvacunación; (Theiler & Smith, 1937; WHO, 2013). Todas las vacunas fabricadas en la actualidad protegen contra todas las cepas salvajes del virus de FA y contienen virus atenuados, derivados de la cepa vacunal 17D.

2.5.2. Cepa 17D

Se emplea actualmente en la inmunización contra la FA a nivel mundial (CDC, 2010), y es la que ha tenido mayor éxito histórico en el control de la enfermedad en África y América debido a los pocos efectos adversos reportados tras su administración.

Se obtuvo empíricamente mediante el pasaje sucesivo de la cepa Asibi (cepa salvaje aislada de la sangre de un paciente africano con FA) sobre cultivos de

tejidos de ratones y pollos. A partir del pasaje 58, el virus fue designado como cepa 17D y se empezó a cultivar *in vitro* en tejidos de embrión de pollo sin cerebro ni médula espinal. Investigaciones orientadas a la evaluación de vacunas, demostraron que a partir del pasaje 89 la cepa 17D atenuó su neurotropismo y viscerotropismo en monos *Rhesus* inoculados por vía subcutánea (Theiler & Smith, 1937; Monath, 2005).

Los pasajes sucesivos realizados sobre esta cepa originaron dos subcepas: 17D-204 y 17DD (Monath, 2005; CDC, 2010). Estudios que comparan la reactogenicidad e inmunogenicidad de estas subcepas sugieren que no existe diferencia sustancial en estos factores, por tanto, todas las personas que reciben vacunas derivadas de cualquiera de estas subcepas deben considerarse protegidas contra la enfermedad (Barnett, 2007; Gershman & Staples, 2017).

Subcepa 17D-204: Se emplea para el desarrollo de vacunas en todos los países excepto Brasil. Tiene gran estabilidad genética (Barban, *et al.*, 2007) y baja diversidad clonal (Salmona, *et al.*, 2015). La cepa viral 17D se mantuvo en pasajes sucesivos hasta el pasaje 204, momento en que se estableció como la subcepa 17D-204. A partir del pasaje 221, la propagación viral se realizó en huevos embrionados de gallina. Las vacunas actuales contienen la subcepa vacunal 17D-204 entre los pasajes 235 y 238 (Monath, 2005), y es la que se emplea en la presente investigación.

Subcepa 17DD: Es empleada en el desarrollo de vacunas en Brasil. La cepa viral 17D se mantuvo en pasajes sucesivos en tejido de embrión de pollo (sin tejido nervioso) hasta el pasaje 195, momento en que se estableció como la subcepa 17DD. La cepa fue enviada al Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro (Brasil) cuando se encontraba en el pasaje 229, y a partir del pasaje 243 fue propagada

en huevos embrionados de gallina. Las vacunas actuales contienen la subcepa vacunal 17DD entre los pasajes 286 - 287 (Monath, 2005).

2.5.3. Dosis de vacunación y rutas de administración.

La dosis de vacunación recomendada no debe contener menos de 3 log₁₀ Unidades Internacionales (UI). La vacuna contra la FA se administra en dosis única de 0,5 mL, por inyección vía subcutánea o intramuscular, a personas que lo requieran, siempre que tengan más de 9 meses de edad (WHO, 2008; WHO, 2013; Gershman & Staples, 2017).

2.5.4. Revacunación

Anteriormente la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendaba dosis de refuerzo cada 10 años después de la primera dosis recibida, sin embargo, en abril del 2013 el Grupo Consultivo Estratégico de Inmunizaciones de la OMS concluyó que una dosis primaria de esta vacuna es suficiente para conferir inmunidad sostenida y protección permanente contra la FA, y por tanto no se necesitan dosis de refuerzo (WHO, 2013). Esta conclusión se basó en investigaciones que revelan que la duración de la inmunidad después de una dosis única de vacuna contra la FA se puede mantener al menos 20 - 35 años, y probablemente, durante toda la vida (Poland, *et al.*, 1981; Niedrig, *et al.*, 1999; Gotuzzo, *et al.*, 2013). Desde el 2016 la Asamblea Mundial de la Salud, a través de las Regulaciones Internacionales de Salud, no exige las dosis de refuerzo cada 10 años posvacunación (WHO, 2014), sin embargo algunos países como Brasil aún mantienen dicha práctica (SVS, 2014).

2.6. Seroconversión

Es el cambio desde un estado seronegativo a seropositivo respecto a la presencia de anticuerpos contra la enfermedad; para demostrar dicho cambio es preciso analizar al menos dos muestras de sueros de una misma persona separados por un intervalo de

tiempo variable. Para evaluar la seroconversión en la presente investigación se tomó como referencia el nivel basal de anticuerpos (previa vacunación), el cual se comparó con los valores de anticuerpos alcanzados a 10 y 40 días posvacunación.

2.7. Evaluación de la seroconversión

Se realiza mediante la detección de anticuerpos IgM, IgG y anticuerpos neutralizantes específicos del virus. Debido al alto grado de reactividad cruzada con los anticuerpos producidos contra otros flavivirus (Dengue y Zika), es fundamental realizar pruebas altamente específicas que consideren la existencia de esta reactividad cruzada (OPS/OMS, 2018).

- **Seroconversión de IgM:** Puede detectarse por ELISA (principalmente, el ELISA de captura de IgM) u otros inmunoensayos (inmunofluorescencia indirecta). La especificidad de ELISA de captura IgM es relativamente alta en infecciones primarias y en la mayoría de las infecciones secundarias por flavivirus, sin embargo, las reacciones cruzadas entre flavivirus suelen complicar la interpretación de resultados (OPS/OMS, 2018).
- **Seroconversión de IgG y anticuerpos neutralizantes:** Involucran la detección de anticuerpos IgG por ELISA y de anticuerpos neutralizantes por PRNT. En general, el PRNT ofrece mayor especificidad que la detección de anticuerpos IgM e IgG totales y es considerado el “estándar de oro” para la detección de anticuerpos neutralizantes (OPS/OMS, 2018).

2.7.1. PRNT

Es una prueba serológica que mide la capacidad que tiene una muestra de suero para neutralizar al virus e impedir su replicación en células susceptibles; el efecto de la actividad neutralizante del suero se evidencia con la reducción en el número de placas (UFP) formadas por el virus, sobre un cultivo celular, respecto al número de placas formadas por un control de virus (Spector & Tauraso, 1968;

DeMadrid & Porterfield, 1969). El término UFP indica la mínima cantidad de virus capaz de formar una placa de lisis en el cultivo celular.

Es una prueba cuantitativa altamente específica y sensible, que ha demostrado tener mejores cualidades diagnósticas en comparación con otras pruebas serológicas empleadas para la evaluación de la respuesta de anticuerpos (inmunofluorescencia, ELISA, inhibición de la hemaglutinación, fijación de complemento y neutralización en ratones lactantes), razón por la cual es considerado “estándar de oro” para la detección de anticuerpos neutralizantes (Spector & Tauraso, 1968; Mason, *et al.*, 1973; Niedrig, *et al.*, 1999; Thomas, *et al.*, 2009; OPS/OMS, 2018).

Descripción del método

El PRNT mide el efecto de anticuerpos neutralizantes sobre la infectividad viral mediante la interacción virus-suero en monocapas de células susceptibles que, luego de ser inoculadas, son cubiertas con medio semisólido que restringe la propagación de la progenie viral; después de un periodo de incubación (que puede variar entre 5 y 9 días dependiendo de la cepa viral empleada), las monocapas de células son teñidas con colorante para visualizar el efecto de la infección viral. Cada virus que inicia una infección productiva produce daño localizado en la monocapa celular (placa de lisis), y cada placa de lisis formada representa una UFP del virus. El porcentaje de reducción de la infectividad viral se determina por comparación de UFP formadas en pocillos inoculados con la mezcla virus-suero y formadas en los pocillos inoculados con controles virales; el título de anticuerpos neutralizantes se calcula según el valor de corte establecido para la reducción de la infectividad viral, siendo los porcentajes de reducción más utilizados 50, 70 y 80% (Roehrig, *et al.*, 2008; IPK, 2013).

Consideraciones para la realización del PRNT

- **Cultivos celulares:** El principal criterio para la elección de la línea celular es su susceptibilidad al virus. Las líneas celulares más empleadas para la evaluación de anticuerpos neutralizantes contra flavivirus son LLC-MK2, BHK-21 y VERO, sin embargo, la OMS evaluó y certificó la línea celular VERO para la producción de vacunas vivas-atenuadas y para la realización de pruebas de PRNT con flavivirus (Roehrig, *et al.*, 2008). La prueba de PRNT se realiza sobre monocapas celulares confluentes, formadas en pozos de placas de cultivo celular.
- **Semilla viral:** El número de pasajes virales aceptados para la prueba de PRNT no ha sido determinado, sin embargo, se recomienda emplear semillas virales con no más de 5 - 10 pasajes en cultivos celulares, a fin de mantener su estabilidad genética e infectividad (Monath, 2005; Roehrig, *et al.*, 2008). Además, se recomienda que la semilla viral haya sido replicada, al menos una vez, en una línea celular de mamífero antes de su uso en la prueba de PRNT (Roehrig, *et al.*, 2008). Para efectos de evaluación de anticuerpos neutralizantes, se recomienda el uso de una dilución de la semilla viral que contenga entre 30 - 40 UFP/50 μ L, a fin de obtener entre de 15 - 20 UFP/pozo de las placas evaluadas (MINSA, 1996; IPK, 2013).
- **Sueros:** Se recomienda el uso de sueros inactivados por calor térmico (56 °C durante 30 minutos) para inactivar al sistema del complemento u otros virus que afecten la evaluación de resultados; también se recomienda la evaluación de diluciones del suero, ya que el suero concentrado puede ser tóxico para las células y puede contener inhibidores no específicos de la replicación viral (Roehrig, *et al.*, 2008).
- **Otras consideraciones:** No hay una normalización en la metodología empleada por los laboratorios que realizan esta prueba, por tanto las condiciones de incubación, método de recubrimiento, método de revelado de

placas y puntos de corte para la reducción de placas utilizados para la obtención de resultados puede variar dependiendo de las características epidemiológicas de los pacientes y de las condiciones técnicas de cada laboratorio (Jonker, *et al.*, 2013; Salje, *et al.*, 2014; Mercier-Delarue, *et al.*, 2017).

2.8. Correlato de protección

El correlato de protección contra la enfermedad está asociado a la presencia de anticuerpos neutralizantes (Reinhardt, *et al.*, 1998; Niedrig, *et al.*, 1999; Hepburn, *et al.*, 2006; Plotkin, 2008; Monath & Vasconcelos, 2015); sin embargo, los mecanismos inmunológicos celulares también otorgan protección contra esta enfermedad (SAGE, 2013) y son mediadores de la intensidad de la respuesta inmunológica humoral (Pulendran, 2009), por tanto, una reducción en la respuesta inmunológica humoral podría indicar también la reducción de la respuesta inmunológica celular, mas no su ausencia. Pese a ello, la estimación del nivel de protección serológico sigue manteniéndose como el correlato de protección para la evaluación de la eficiencia de vacunas como la administrada contra la FA (Plotkin, 2008; WHO, 2008; Monath, *et al.*, 2013; WHO, 2013).

La correspondencia entre la protección contra el virus de FA y el título de anticuerpos neutralizantes fue establecida en monos infectados con virus de FA (Mason, *et al.*, 1973). La supervivencia de estos animales fue buena cuando el valor del Índice Logarítmico de Neutralización (ILN) fue mayor a 0,7, y de forma contraria, se produjo la muerte cuando el valor del ILN fue menor a 0,7; el valor del ILN se define como la diferencia de los logaritmos del número de UFP observados tras el enfrentamiento del virus con un suero pre inmune, menos el número de UFP observadas tras el enfrentamiento del virus con el suero inmunizado. El resultado de esta investigación condujo a la aceptación mundial de que valores mayores a 0,7 de ILN establecen la protección inmunológica contra la FA (WHO, 2013).

Debido a que este correlato fue realizado con una metodología del PRNT que ya no se usa actualmente (debido a la menor sensibilidad mostrada a comparación del método actual que emplea diluciones seriadas de suero y diluciones fijas de virus), se opta por aceptar el valor equivalente a 0,7 ILN, lo cual significa aceptar la protección cuando ocurre un 80% de reducción (punto de corte) de UFP respecto de las UFP presentes en los controles virales (PRNT₈₀); sin embargo, la dilución de anticuerpos sobre la que se debe evaluar este punto de corte no está claramente determinada, por lo cual los investigadores toman como referencia la dilución de 1:10 de las muestras de sueros, basándose en la investigación desarrollada por Freestone y colaboradores en 1977, donde se emplean diluciones finales de suero de 1:10 para evaluar la respuesta inmunológica humana frente a diferentes dosis de la vacuna 17D de FA (Freestone, *et al.*, 1977) y en los resultados de la investigación de Julander y colaboradores en el 2011, donde hallan protección, desde esta misma dilución, tras la inmunización pasiva de hámsters con anticuerpos específicos contra FA (Julander *et al.*, 2011).

Por tales motivos, se considera que una persona se encuentra protegida contra el virus de FA cuando presenta anticuerpos neutralizantes, en títulos mayores o iguales a 1:10, en una evaluación realizada mediante la prueba de PRNT₈₀ (Mason, *et al.*, 1973; Freestone, *et al.*, 1977; Roukens, *et al.*, 2009; WHO, 2013).

2.9. Fallas en la seroconversión

Muchas investigaciones han descrito que los hábitos alimenticios y la desnutrición pueden influir en la composición de la microbiota intestinal (Subramanian, *et al.*, 2014; Tilg & Moschen, 2015; Million, *et al.*, 2017); asimismo, los desbalances en la composición de la microbiota intestinal podrían generar disbiosis bacterianas que afectan gravemente la respuesta inmunológica y conllevan a fallas en la seroconversión (Kau, *et al.*, 2011; Brown, *et al.*, 2012; Brodin & Davis, 2017). La carga genética, también es un factor que podría ser causante de disminuciones en la respuesta inmunológica; algunas investigaciones han reportado que el factor genético

que determina las características raciales puede estar asociado a diferencias en la respuesta inmunológica contra la FA (Monath, *et al.*, 2002; Blake & García-Blanco, 2014; Beck & Barrett, 2015), asimismo, se ha reportado que factores genéticos que determinan la regulación de la frecuencia de las células inmunológicas y la regulación de la producción de citoquinas podrían afectar el desarrollo de la respuesta inmunológica frente a enfermedades causadas por muchos agentes infecciosos (Brodin & Davis, 2017), entre ellos la FA.

2.10. Importancia y beneficios de la vacunación

En general, la vacuna con la cepa 17D es un método eficaz para la prevención de la enfermedad de FA, y a pesar de la aparición de casos adversos, la relación beneficio-riesgo es muy positiva para el control de brotes de FA. Como con todas las vacunas, es necesario considerar cuidadosamente si la persona debe recibir la vacuna o no, y claramente, deben ser vacunadas solo aquellas personas que tienen un riesgo demostrable de adquirir FA.

III. HIPOTESIS DE INVESTIGACIÓN

En la población vacunada con la cepa 17D-204 en zona no endémica, más del 80% seroconvierte para anticuerpos neutralizantes contra el virus de fiebre amarilla con títulos mayores o iguales a 1:10 a partir del día 10 posvacunación.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la seroconversión de anticuerpos neutralizantes en personas sanas vacunadas contra el virus fiebre amarilla mediante neutralización por reducción de placas en zonas no endémicas.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar los títulos de anticuerpos neutralizantes, de personas sanas vacunadas contra FA, mediante PRNT₈₀.
- Establecer las diferencias de los títulos de anticuerpos neutralizantes con relación al tiempo posvacunación, sexo y edad.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Virología Clínica y Molecular ubicado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

5.1. Diseño de la investigación

La investigación desarrollada fue descriptiva, observacional, longitudinal y de tipo exploratorio.

5.2. Muestra

El muestreo fue no probabilístico de tipo bola de nieve. La muestra estuvo conformada por personas mayores de 18 años en aparente estado de inmunocompetencia que tuvieron la necesidad de vacunarse contra la FA. Los participantes fueron principalmente personas relacionadas a investigación en salud y ciencias biológicas que otorgaron su consentimiento informado de participación en la investigación y obtuvieron un documento/cartilla que acreditó su vacunación contra la FA.

5.2.1. Criterios de selección

Fueron establecidos con la finalidad de minimizar la interferencia de factores que alteren la respuesta inmunológica y por tanto los resultados de seroconversión.

Criterios de inclusión

- No contar con antecedente de vacunación contra la FA.
- Permanecer en zonas no endémicas a FA durante el desarrollo de la investigación.

Criterios de exclusión

- Ser menor de edad (< 18 años).
- Ser de la tercera edad (> 60 años).
- Encontrarse en periodos de gestación.

- Tener una condición médica crónica progresiva y grave que altere la funcionalidad del sistema inmunológico (diabetes, disfunción renal o hepática, VIH, Hepatitis B o C).
- Haber nacido y/o residir (o haberlo hecho en algún momento) en zonas endémicas para FA y otros flavivirus.
- Tener antecedente de infección natural causada por FA y/u otros flavivirus.

5.2.2. Consentimiento informado

A los participantes seleccionados se les brindó información sobre el propósito de la investigación y el grado de su participación, además se les proporcionó un documento (que contuvo una hoja de explicación y una hoja de firmas) para otorgar el consentimiento informado que quedó bajo responsabilidad de la investigadora principal (Formato del Consentimiento Informado en Anexo 1).

5.3. Obtención de muestras de sueros

Por cada participante se obtuvo muestras de sangre periférica en tres momentos: antes de la vacunación (1º momento), día 10 posvacunación (2º momento) y día 40 posvacunación (3º momento). Las muestras se obtuvieron por punción venosa y fueron colectadas en tubos estériles sin anticoagulante, mediante el uso de sistemas al vacío.

Las muestras obtenidas se dejaron en reposo a temperatura ambiente entre 30 minutos a 2 horas, para luego ser centrifugadas (2500 rpm y temperatura ambiente) durante 5 minutos; algunas muestras fueron mantenidas en refrigeración (4 °C) por un periodo máximo de tres horas hasta ser centrifugadas. Los sueros separados se colectaron en crioviales y se almacenaron a temperatura de -80 °C en hasta su uso.

5.4. Establecimiento de un sistema de cultivos celulares con la línea celular Vero-76.

Para el establecimiento de un sistema de cultivos celulares, se tomó como base las metodologías descritas en el *Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Arbovirosis* del Ministerio Nacional de Salud del Perú (MINSA, 1996) y el manual de *Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización de los Virus del Dengue* del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” de Cuba (IPK, 2013), con algunas modificaciones.

Descongelación y siembra de células.

Se empleó una semilla de la línea celular Vero-76. El criovial fue sumergido en baño maría a 37 °C hasta su descongelamiento, e inoculado en un frasco de cultivo celular de 25 cm² (hermético) con 10 mL de medio de crecimiento (MC). El frasco de cultivo con el inóculo de células se mantuvo en incubación a 37 °C sin CO₂, realizándole cambios de medio a 1 y 24 horas después de la inoculación; tras éste periodo, los cambios de medio se realizaron tras la formación de monocapa confluyente.

En todo momento se empleó MC, cuya composición se detalla en el Anexo 2.

Propagación de la línea celular

Cuando la monocapa estuvo formada confluentemente, se descartó el medio del frasco de cultivo y se lavó con MC para eliminar residuos celulares; se añadió 1200 µL de una solución de Tripsina al 0,48%, ladeando suavemente durante 1 minuto antes de descartar; se repitió el procedimiento una vez más y se dejó en incubación a 37 °C durante 10 minutos. Después de este tiempo, se agregó MC y se homogenizó vigorosamente hasta disgregar las células y conseguir una suspensión uniforme, que fue distribuida en frascos de cultivo celular de 75 cm² (hermético); los frascos se enrasaron con MC hasta un volumen de 15 - 20 mL y se mantuvieron en incubación a 37 °C sin CO₂ hasta la formación de monocapa.

5.5. Producción de semillas virales.

Se empleó la cepa vacunal 17D-204 del virus FA, proveniente de la vacuna Stamaril® Sanofi Pasteur (Lote K5338).

Infección

El contenido de la vacuna fue diluido a 1:10 e inoculado, en volumen de 200 µL, sobre un frasco de cultivo celular de 25 cm² con monocapa confluyente de células Vero-76, al que previamente se le retiró el MC; el frasco permaneció en incubación durante 1 hora a 37 °C sin CO₂. Al término de este tiempo se adicionó 10 mL de medio de mantenimiento (MM) y se mantuvo en incubación con las condiciones ya descritas hasta la aparición de efecto citopático (ECP). La composición del MM se detalla en el Anexo 2.

Cosecha viral

Se realizó cuando el ECP alcanzó 3 cruces (3+) de infección, equivalente al 75% de desprendimiento celular de la monocapa. El MM fue colectado y centrifugado (10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C). El sobrenadante se alicuotó en crioviales (500 µL/criovial), se rotuló con el nombre y número de pasaje viral correspondiente, y se almacenó a -80 °C. El sobrenadante fue mantenido en cadena de frío (~4 °C) desde la centrifugación hasta su almacenamiento a -80 °C. Se repitió el procedimiento de infección y cosecha viral 2 veces adicionales hasta obtener el pasaje 3 (P3) de semillas virales de la cepa vacunal 17D-204 del virus de FA.

5.6. Titulación de semilla viral en células Vero-76. Método de recubrimiento semisólido.

Se tomó como base las metodologías descritas en el *Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Arbovirosis* del Ministerio Nacional de Salud del Perú (MINSA, 1996) y el manual de *Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y*

Caracterización de los virus del Dengue del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” de Cuba (IPK, 2013), con algunas modificaciones.

Preparación de placas con cultivo celular

Se emplearon dos frascos de cultivo celular (75cm²) con monocapa confluyente de la línea celular especificada. La metodología empleada fue la descrita en la sección *Propagación de la línea celular* hasta la obtención de la suspensión celular uniforme, a partir de la cual se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer, previa mezcla con el colorante vital azul de tripán. La concentración celular se ajustó a $1,25 \times 10^5$ células/mL mediante la Ecuación 1 que se describe en el Anexo 7.

La suspensión de células fue distribuida a razón de 500 µL/pozo sobre una placa de cultivo celular de 24 pozos, la cual se mantuvo en incubación a 37 °C sin CO₂ durante 48 horas.

Titulación viral

El P3 de semillas virales fue diluido decimalmente de forma seriada de la siguiente manera: se descongeló brevemente a 37 °C y se transfirió 100 µL a un tubo rotulado como “10⁻¹” que contenía 900 µL de MM (al igual que una serie de tubos rotulados hasta 10⁻⁷); inmediatamente se homogenizó vigorosamente y se transfirió 100 µL del tubo 10⁻¹ al siguiente tubo correlativo y así sucesivamente. Se realizaron diluciones adicionales entre las diluciones decimales, a fin de obtener mejor resolución en los resultados.

Se inoculó 50 µL de cada dilución viral sobre los pozos de las placas de cultivo celular con monocapa confluyente (tres repeticiones por dilución), dejando tres pozos sin inocular, a los cuales solo se añadió 50 µL de MM (control de células). Las placas se incubaron a 37 °C sin CO₂ durante 4 horas, realizando homogenizaciones por cada hora transcurrida; al término de este periodo se agregó 500 µL/pozo de medio de recubrimiento con carboximetilcelulosa (CMC) a cada placa, para luego ser

mantenidas en incubación a 37 °C sin CO₂ durante 5 días. La composición del medio de recubrimiento se detalla en el Anexo 2.

Transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el medio contenido en las placas de cultivo celular y se adicionó 500 µL/pozo de colorante Azul Negro de Naftol (NBB, por sus siglas en inglés); las placas se colorearon durante 12 horas a temperatura ambiente para posteriormente ser lavadas con agua corriente. La composición del NBB se detalla en el Anexo 2.

Determinación del título viral

Se contaron las UFP formadas en cada pozo de las placas de cultivo celular. El título viral se determinó con la Ecuación 2 que se describe en el Anexo 7.

5.7. Determinación del título de anticuerpos neutralizantes, de personas sanas vacunadas contra FA, mediante la prueba de PRNT₈₀.

Preparación de placas con cultivo celular.

La propagación celular se realizó de la misma forma descrita en la sección *Preparación de placas con cultivo celular*.

Diluciones de sueros.

Se emplearon sueros inactivados a 56 °C durante 30 minutos. Las diluciones se realizaron en MM; todo el proceso se realizó en cadena de frío (~4 °C). A las muestras de suero obtenidas antes de la vacunación se les realizó una dilución única de 1:5, a las muestras de suero obtenidas en el día 10 posvacunación se le realizaron diluciones seriadas en base 2 desde 1:40 hasta 1:640, y a las muestras de suero obtenidas en el día 40 posvacunación se le realizaron diluciones seriadas en base 2 desde 1:160 hasta 1:2 560. Se realizaron repeticiones, con diluciones seriadas en base 2, desde 1:5 hasta 1:20 480 (dependiendo de lo requerido). Por cada prueba realizada se incluyó un suero control negativo y uno positivo a anticuerpos

neutralizantes contra FA; al control negativo se le realizó una dilución única de 1:5 y al control positivo se le realizó diluciones seriadas en base 2 desde 1:40 hasta 1:640. Las diluciones realizadas fueron refrigeradas (4 °C) hasta su uso posterior (máximo dos horas después de la dilución).

Dilución viral de trabajo.

Tras obtener el título viral del P3 de semillas virales (resultados en Anexo 3), se preparó una dilución con aproximadamente 30 UFP/50 µL y MM como diluyente; todo el procedimiento se realizó en cadena de frío (~4 °C). El volumen de la dilución preparada estuvo en función de la cantidad de diluciones de suero evaluadas por prueba (incluyendo repeticiones) y la cantidad de controles empleados.

Mezcla de las diluciones de suero y virus.

Se realizó en tubos colectores estériles. Se mezcló 100 µL de las diluciones de suero con 100 µL de la dilución viral de trabajo; las mezclas se mantuvieron en incubación a 37 °C durante 1 hora.

En paralelo, se mezcló 200 µL de la dilución viral de trabajo con 200 µL de MM, a fin de obtener una solución que sirva como control de virus; esta mezcla se mantuvo en incubación junto a las mezclas virus-suero. Todo el procedimiento se realizó en cadena de frío (~4 °C) hasta el momento previo a la incubación.

Inoculación de placas con cultivos celulares.

Se inoculó por duplicado 50 µL/pozo de cada mezcla virus-suero y del control de virus; para el control de células se inoculó por duplicado 50 µL de MM. Las placas se sellaron herméticamente con una bolsa plástica y se incubaron a 37 °C sin CO₂ durante 4 horas, realizando homogenizaciones después de cada hora transcurrida. Al término de ese tiempo se añadió el medio CMC doblemente concentrado, siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección *Titulación viral*, desde la adición del medio hasta la coloración de placas (incluyendo las condiciones de incubación).

Cálculo del porcentaje de reducción de UFP

Se calculó el promedio de UFP presentes en los pozos correspondientes a los controles virales, y en base a ello se realizó el cálculo del porcentaje de reducción de UFP por cada dilución de suero evaluada, mediante la Ecuación 3 que se describe en el Anexo 7.

Se consideró como “dilución de suero evaluada” a la dilución de suero resultante tras mezclar las diluciones iniciales del suero y las diluciones virales.

Cálculo del título de anticuerpos neutralizantes contra FA

El valor del título de anticuerpos neutralizantes contra FA se calculó con dos métodos:

- a. **Método clásico:** El título de anticuerpos neutralizantes contra FA se expresó como el valor recíproco de la dilución más alta de suero capaz de neutralizar el 80% o más de las UFP.
- b. **Método de regresión lineal:** El título de anticuerpos neutralizantes contra FA se expresó como el valor recíproco de la dilución de suero capaz de neutralizar exactamente el 80% de las UFP (título a punto final); el valor de dicha dilución se obtuvo por regresión lineal.

Se consideró el título 1:10 de anticuerpos neutralizantes como el límite inferior que indica protección serológica contra la infección causada por el virus FA, de este modo, los títulos de anticuerpos neutralizantes con valores $\geq 1:10$ fueron considerados positivos a protección contra FA (Freestone *et al.*, 1977; Juander *et al.*, 2011).

5.8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se organizaron en tablas univariadas y bivariadas; para la realización de tablas, gráficos y pruebas estadísticas se empleó el software Microsoft Office Excel 2013 y el paquete estadístico SPSS v25.

Se utilizaron análisis descriptivos de promedios, medias geométricas, desviación estándar e intervalos de confianza al 95% para evaluar características demográficas de los participantes, títulos virales y títulos de anticuerpos neutralizantes contra FA. Para calcular los títulos a punto final de anticuerpos neutralizantes se aplicó un análisis de regresión lineal simple. Los títulos de anticuerpos neutralizantes fueron transformados a \log_{10} para el análisis estadístico.

La prueba de rangos con signo de Wilcoxon se usó para comparar variables continuas (títulos de anticuerpos neutralizantes) en muestras relacionadas (métodos de cálculo del título de anticuerpos neutralizantes y tiempo posvacunación). La prueba de U de Mann-Whitney se usó para comparar las variables continuas (títulos de anticuerpos neutralizantes) en muestras independientes (sexo). La correlación entre los títulos de anticuerpos neutralizantes y la edad de los participantes se describió mediante el coeficiente de Spearman.

VI. RESULTADOS

6.1. Títulos de anticuerpos neutralizantes de personas sanas vacunadas contra FA, determinados mediante PRNT₈₀.

Se evaluó 30 participantes sanos con títulos no protectores de anticuerpos neutralizantes previa vacunación contra FA.

Tabla 1. Características demográficas de los participantes.

	Varones (n=12)	Mujeres (n=18)	Total (n=30)
Edad			
Promedio (DE)	23,3 (3,1)	22,2 (4,4)	22,7 (3,9)
[IC 95%]	[21,35 - 25,31]	[20,05 - 24,40]	[21,21 - 24,12]

DE: Desviación estándar

Para determinar los títulos de anticuerpos neutralizantes, se consideraron solo los recuentos de UFP con coeficiente de variación menor al 20%, tanto para las diluciones de suero evaluadas, como para los controles virales. Resultados fuera de ese rango implicaron la repetición de la prueba.

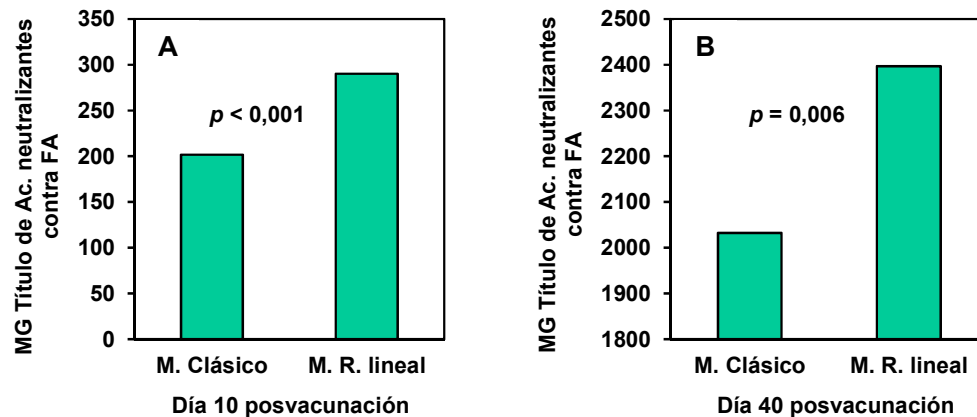
Tabla 2. Características y títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla de los participantes en los días 10 y 40 posvacunación.

Muestra	Sexo	Edad	Título de Ac. Neutralizantes contra FA			
			10 días posvacunación		40 días posvacunación	
			M. Clásico	M. R. lineal	M. Clásico	M. R. lineal
1	V	24	320	451	2560	2911
2	V	28	640	960	2560	4162
3	V	20	1280	1444	1280	2102
4	V	19	160	246	2560	2883
5	V	25	160	164	2560	4080
6	V	25	320	572	5120	5354
7	V	24	320	342	1280	1944
8	V	29	320	695	10240	11103
9	V	21	320	423	1280	1655
10	V	21	80	109	2560	4405
11	V	21	80	143	1280	1063
12	V	23	640	864	5120	4894
13	M	20	80	175	2560	2915
14	M	20	160	206	1280	2309
15	M	21	160	215	1280	2005
16	M	21	320	519	5120	5905
17	M	19	160	191	1280	1497
18	M	20	320	520	1280	1097
19	M	24	80	111	2560	3269
20	M	22	40	48	1280	1062
21	M	27	640	575	1280	1330
22	M	37	320	429	1280	1709
23	M	20	160	207	1280	951
24	M	27	1280	1743	20480	32750
25	M	20	640	1037	2560	1746
26	M	20	640	1345	1280	1429
27	M	19	10	14	640	943
28	M	21	80	130	640	948
29	M	21	40	91	2560	1847
30	M	21	80	89	1280	1409
Log₁₀ Media Geométrica; (DE)			2,30; (0,48)	2,46; (0,47)	3,31; (0,33)	3,38; (0,35)
[IC 95% (log₁₀)]			[2,13 - 2,48]	[2,29 - 2,64]	[3,18 - 3,43]	[3,25 - 3,51]
Valor p			< 0,001		0,006	

Valor p: Nivel de significancia (prueba de rangos con signo de Wilcoxon) para establecer diferencias entre títulos de Ac. neutralizantes contra Fiebre Amarilla obtenidos por método clásico y método de regresión lineal.

V: Varón; M: Mujer

Los títulos obtenidos con el método de regresión lineal fueron significativamente mayores (prueba de rangos con signo de Wilcoxon) que los títulos obtenidos por el método clásico en los días 10 y 40 posvacunación ($p < 0,001$ y $p = 0,006$ respectivamente), como se muestra en la Tabla 2 y en la Figura 1.



MG: Media Geométrica.

Valor p : Nivel de significancia (prueba de rangos con signo de Wilcoxon).

Figura 1. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla obtenidos con el método clásico y el método de regresión lineal. **(A)** Títulos alcanzados en el día 10 posvacunación. **(B)** Títulos alcanzados en el día 40 posvacunación.

A partir del día 10 posvacunación, el 100% (30/30) de los participantes mostró seroconversión con títulos de anticuerpos neutralizantes mayores a 1:10. Asimismo, en el día 10 posvacunación, el 96,7% (29/30) mostró seroconversión con un incremento mayor a cuatro veces sobre el título basal de anticuerpos neutralizantes obtenidos previa vacunación contra la FA, llegando a ser el 100% para el día 40 posvacunación.

Las Tablas 3 y 4 muestran los títulos de los controles de suero y virus empleados en las pruebas de PRNT₈₀ realizadas para la evaluación de seroconversión.

Tabla 3. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre amarilla obtenidos por el control positivo y negativo de las pruebas PRNT₈₀ realizadas para evaluación de seroconversión.

Repeticiones	Títulos de Ac. Neutralizantes contra FA	
	Control Positivo* (CP5)	Control Negativo (CN5)
1	277	<10
2	293	<10
3	276	<10
4	286	<10
5	283	<10
6	284	<10
7	270	<10
8	284	<10
9	319	<10
10	294	<10
Log₁₀ Media Geométrica; (DE)	2,46; (0,02)	-
[IC 95% (log₁₀)]	[2,44 – 2,47]	-

*Títulos obtenidos mediante regresión lineal.

Tabla 4. Títulos virales obtenidos por el control de virus en las pruebas de PRNT₈₀ realizadas para evaluación de seroconversión.

Nº Repeticiones	Título Viral (UFP/mL)
1	1,50 x 10 ⁷
2	1,03 x 10 ⁷
3	1,07 x 10 ⁷
4	1,50 x 10 ⁷
5	1,18 x 10 ⁷
6	1,57 x 10 ⁷
7	1,28 x 10 ⁷
8	1,07 x 10 ⁷
9	1,43 x 10 ⁷
10	1,28 x 10 ⁷
11	1,14 x 10 ⁷
12	1,57 x 10 ⁷
13	1,18 x 10 ⁷
Log₁₀ Media Geométrica; (DE)	7,11; (0,07)
[IC 95% (log₁₀)]	[7,07 - 7,15]

Para evaluar la influencia del punto de corte de reducción de placas, evaluado en el PRNT₈₀ (80% reducción), sobre los títulos de anticuerpos neutralizantes, se empleó puntos de corte alternativos: 50, 60, 70, 90 y 100% de reducción de placas, usando el método de regresión lineal (Tablas 5 y 6). El valor de los títulos de anticuerpos neutralizantes disminuye cuando se incrementa el valor del punto de corte del PRNT.

Tabla 5. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla obtenidos de la evaluación de 6 puntos de corte del PRNT en el día 10 posvacunación.

Título de Ac. neutralizantes contra FA	Puntos de corte del PRNT en el día 10 posvacunación (%Reducción)					
	50%	60%	70%	80%	90%	100%
<10	0	0	0	0	2	14
[10 - 20 >	0	0	1	1	2	1
[20 - 40 >	1	1	0	0	1	1
[40 - 80 >	0	0	0	1	3	2
[80 - 160 >	0	1	5	6	8	11
[160 - 320 >	8	8	7	7	8	0
[320 - 640 >	4	4	2	8	4	1
[640 - 1280 >	3	6	10	4	2	0
[1280 - 2560 >	9	6	4	3	0	0
[2560 - 5120 >	4	4	1	0	0	0
[5120 - 10240 >	1	0	0	0	0	0
Total de muestras	30	30	30	30	30	30

Tabla 6. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla obtenidos de la evaluación de 6 puntos de corte del PRNT en el día 40 posvacunación.

Título de Ac. neutralizantes contra FA	Puntos de corte del PRNT en el día 40 posvacunación (%Reducción)					
	50%	60%	70%	80%	90%	100%
<10	0	0	0	0	0	11
[10 - 20 >	0	0	0	0	0	0
[20 - 40 >	0	0	0	0	0	0
[40 - 80 >	0	0	0	0	0	1
[80 - 160 >	0	0	0	0	2	1
[160 - 320 >	0	0	0	0	1	4
[320 - 640 >	0	0	0	0	2	7
[640 - 1280 >	1	2	2	6	16	4
[1280 - 2560 >	3	4	9	12	5	0
[2560 - 5120 >	9	9	10	8	2	1
[5120 - 10240 >	8	11	7	2	1	0
[10240 - 20480 >	7	2	1	1	0	1
[20480 - 40960 >	1	1	0	1	1	0
[40960 - 81920 >	1	1	1	0	0	0
Total de muestras	30	30	30	30	30	30

La persona que no mostró incremento cuádruple en la seroconversión en el día 10 posvacunación para la prueba de PRNT₈₀, tampoco lo hizo en las pruebas de PRNT con puntos de corte alternativos (Tabla 7).

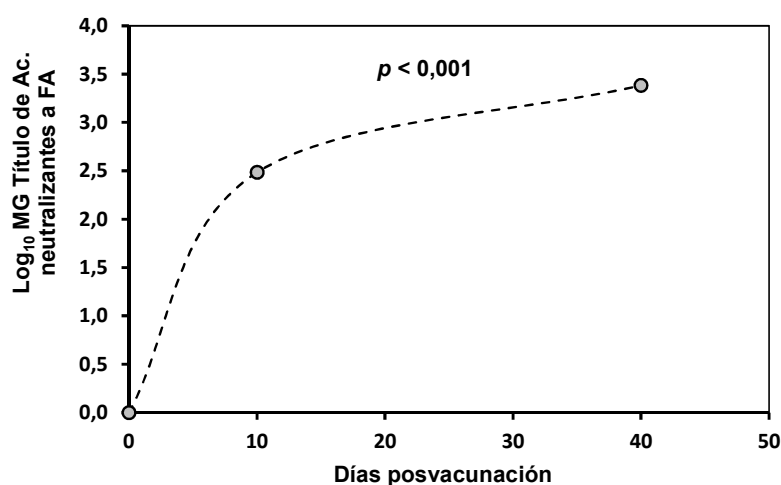
Tabla 7. Características demográficas y títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla obtenidos por la persona que no mostró incremento en la seroconversión en el día 10 posvacunación.

Características Demográficas			
Sexo		Femenino	
Edad en el momento de la vacunación		19 años	
Título de Ac. neutralizantes contra FA			
Punto de corte del PRNT	Prevacunación	Día posvacunación	
		10	40
50 %	<10	24	1278
60 %	<10	20	1148
70 %	<10	17	1038
80 %	<10	14	943
90 %	<10	11	859
100 %	<10	9	784

6.2. Diferencias de los títulos de anticuerpos neutralizantes con relación al tiempo posvacunación, sexo y edad.

Diferencias de los títulos de anticuerpos neutralizantes con relación al tiempo posvacunación

Se halló que títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos en el día 40 posvacunación fueron significativamente mayores (prueba de rangos con signo de Wilcoxon) que los obtenidos en el día 10 posvacunación ($p < 0,001$), como se muestra en la Figura 2.



MG: Media Geométrica de los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos por regresión lineal
 Valor p : Nivel de significancia (prueba de rangos con signo de Wilcoxon)

Figura 2. Curva de seroconversión de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla, medidos mediante PRNT₈₀, en los 2 momentos de evaluación.

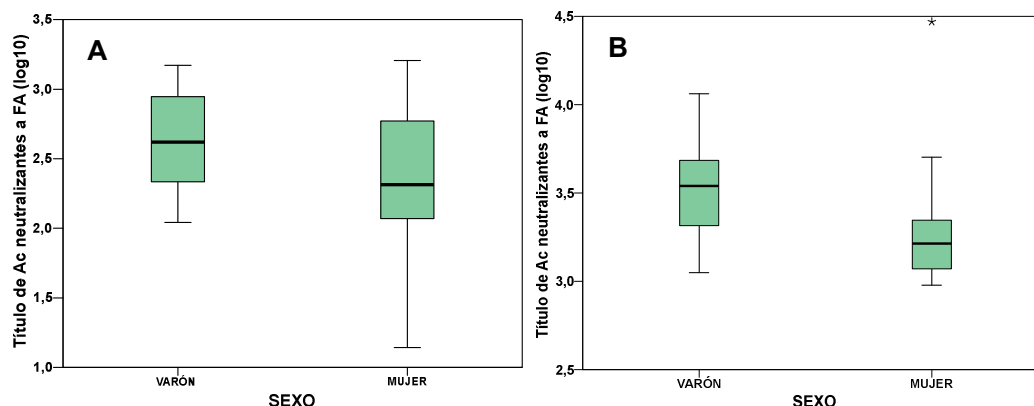
Diferencias de los títulos de anticuerpos neutralizantes con relación al sexo

No hubo diferencias significativas (prueba U de Mann-Whitney) entre los títulos de anticuerpos neutralizantes alcanzados por varones y mujeres en el día 10 posvacunación ($p = 0,220$); sin embargo, los títulos de anticuerpos neutralizantes alcanzados por los varones fueron significativamente mayores en el día 40 posvacunación ($p = 0,020$), como se muestra en la Tabla 8. La Figura 5 muestra la distribución del título de anticuerpos neutralizantes, según sexo, en los dos momentos de evaluación.

Tabla 8. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra FA alcanzados por varones y mujeres en el día 10 y 40 posvacunación.

Título de Ac. Neutralizantes contra FA	Varones	Mujeres	Valor <i>p</i>
10 días posvacunación			
Log ₁₀ Media Geométrica; (DE)	2,61; (0,35)	2,37; (0,53)	0,220
[IC 95% (log ₁₀)]	[2,38 - 2,83]	[2,10 – 2,63]	
40 días posvacunación			
Log ₁₀ Media Geométrica; (DE)	3,51; (0,27)	3,29; (0,37)	0,020
[IC 95% (log ₁₀)]	[3,34 – 3,68]	[3,11 – 3,48]	

Valor p : Nivel de significancia (prueba U de Mann Whitney) para establecer diferencias entre títulos de anticuerpos neutralizantes contra la FA alcanzados por varones y mujeres.



(*): Valor atípico

Figura 3. Distribución de títulos de anticuerpos neutralizantes, obtenidos mediante regresión lineal, según sexo. **(A)** Distribución del título de anticuerpos neutralizantes al día 10 posvacunación. **(B)** Distribución del título de anticuerpos neutralizantes al día 40 posvacunación.

Diferencias de los títulos de anticuerpos neutralizantes con relación a la edad

No hubo correlación entre la edad y los títulos de anticuerpos neutralizantes contra FA alcanzados por los participantes en el día 10 posvacunación ($\rho_{\text{Spearman}} = + 0,24$ y $p = 0,206$); sin embargo, en el día 40 posvacunación sí se encontró una relación lineal, moderada y directamente proporcional ($\rho_{\text{Spearman}} = + 0,44$ y $p = 0,02$) que estuvo determinada por los varones ($\rho_{\text{Spearman}} = + 0,60$ y $p = 0,04$), como se muestra en la Figura 4, ya que en las mujeres no se halló dicha correlación ($\rho_{\text{Spearman}} = + 0,28$ y $p = 0,26$).

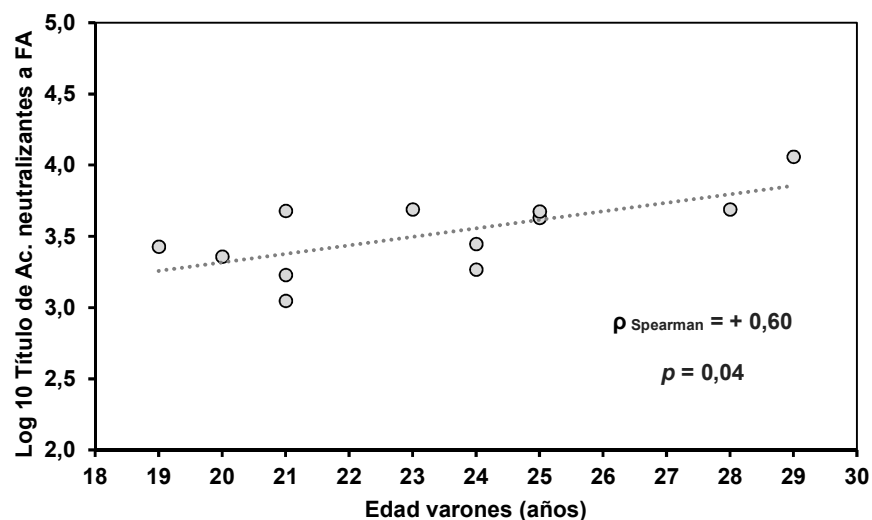


Figura 4. Gráfico de dispersión de Títulos de anticuerpos neutralizantes contra Fiebre Amarilla, y la edad de los varones en el día 40 posvacunación.

VII. DISCUSIÓN

La presente investigación evaluó la seroconversión de anticuerpos neutralizantes contra fiebre amarilla en 30 participantes sin antecedente de vacunación, a 10 y 40 días posvacunación. Los anticuerpos neutralizantes fueron evaluados mediante la prueba de PRNT₈₀, una prueba cuantitativa, altamente sensible y específica (Niedrig, *et al.*, 1999; OPS/OMS, 2018). La semilla viral empleada tuvo 3 pasajes a partir de la cepa vacunal 17D-204, siguiendo las recomendaciones de la OMS (Roehrig, *et al.*, 2008), a fin de evitar alteraciones en las características de la cepa utilizada (Monath, 2005; Barrett & Teuwen, 2009), lo cual se reflejó en la estrechez de los IC 95% de la media de los controles de suero y virus (Tablas 3 y 4), mostrando la repetibilidad del ensayo realizado.

Los momentos de evaluación del título de anticuerpos neutralizantes fueron elegidos según su representatividad en el curso de la seroconversión. Conocer los títulos de anticuerpos neutralizantes alcanzados en el día 10 posvacunación permite obtener información sobre el estado de protección, de las personas vacunadas, en el momento en que el RSI permite el ingreso a zonas endémicas para FA (WHO, 1983). El día 40 posvacunación es un momento comprendido entre las 4 - 6 semanas en que los títulos de anticuerpos neutralizantes alcanzan sus máximos valores (Pulendran, 2009), por tanto, conocerlos permite obtener información sobre la cinética de seroconversión tras la vacunación contra la FA.

El método de cálculo del título de anticuerpos neutralizantes es determinante para evaluar la seroconversión, ya que valores poco precisos podrían desestimar el potencial neutralizante de las muestras de suero evaluadas; a fin de evitar sesgos en la interpretación de los resultados de seroconversión, se determinó la diferencia entre los dos métodos de cálculo empleados (método clásico y método de regresión lineal), hallando que los valores obtenidos por regresión lineal fueron significativamente

mayores a 10 y 40 días posvacunación ($p < 0,001$ y $p = 0,006$ respectivamente) como se mostró en la Tabla 2 y la Figura 1. Considerando que el método de regresión lineal permite hallar la dilución de suero que neutraliza exactamente el 80% de placas (empleando para ello coeficientes R^2 mayores a 0,9) y teniendo en cuenta que los títulos obtenidos fueron mayores, se respalda el uso de este método para la determinación del título de anticuerpos neutralizantes contra FA en pruebas de PRNT.

Uno de los principales hallazgos de la presente investigación fue que el 100% de los participantes presentó seroconversión, con títulos de anticuerpos neutralizantes mayores a 1:10, en los días 10 y 40 posvacunación, con valor mínimo de 1:14 y máximo de 1:1 743 para el día 10 posvacunación, y mínimo de 1:943 y máximo de 1:32 750 para el día 40 posvacunación. Estos hallazgos fueron lo esperado tras evaluar la respuesta inmunológica, mediada por anticuerpos neutralizantes, de un grupo de adultos jóvenes, sanos y en aparente estado de inmunocompetencia, y respaldan la posición de la OMS sobre los porcentajes de seroconversión esperados (80 - 100%) tras la vacunación contra la FA (WHO, 2013).

Así mismo, este hallazgo concuerda con los resultados de investigaciones que evaluaron la seroconversión en momentos cercanos a los 10 días posvacunación: Reinhardt, *et al.*, en 1998 hallaron, mediante la evaluación con PRNT₉₀, que el 100% (12/12) de un grupo de participantes con edades entre 18 y 50 años presentó seroconversión a 13 y 26 días posvacunación (cepa 17D), siendo la media de los títulos de anticuerpos hallados 1:71 y 1:88 respectivamente; Kongsgaard, *et al.*, en el 2017, también hallaron, mediante evaluaciones con PRNT₅₀, que el 100% (28/28) de un grupo de participantes con edades entre 18 y 68 años presentó seroconversión entre los días 12 y 22 posvacunación (cepa 17D-204 Stamaril), siendo la media de los títulos de anticuerpos hallados 1:1 280, con un rango de 1:160 a 1:20 480.

Uno de los puntos críticos en la metodología del PRNT es el valor de corte empleado para determinar los títulos de anticuerpos neutralizantes. En las Tablas 5 y 6 se mostró que a medida que el valor de corte se acercó al 100%, el valor de los títulos de anticuerpos neutralizantes disminuyó, lo cual explica por qué los títulos de anticuerpos reportados por Reinhardt, *et al.*, en 1998 son más bajos que los reportados en la presente investigación, ya que ellos emplearon un valor de corte del 90%, a diferencia del valor de corte del 80% empleado en la presente investigación; del mismo modo se explica por qué los títulos de anticuerpos reportados por Kongsgaard, *et al.*, en el 2017 son más altos, ya que ellos emplearon un valor de corte del 50%.

No existe un consenso que establezca un valor de corte para las pruebas de PRNT, por esta razón los laboratorios que centran sus investigaciones en flavivirus emplean diferentes valores de corte: 50% (Kay, *et al.*, 2011; Simoes, *et al.*, 2012; Collaborative group for studies on yellow fever vaccines, 2014; Miyaji, *et al.*, 2016; Kongsgaard, *et al.*, 2017), 70% (Acuña, *et al.*, 2001), 75% (Gómez & Ocazonez, 2008; Salje, *et al.*, 2014), 80% (Hepburn, *et al.*, 2006; Roukens, *et al.*, 2009; Lang, *et al.*, 1999; Roukens, *et al.*, 2011) y 90% (Reinhardt, *et al.*, 1998; Niedrig, *et al.*, 1999); ante esta situación, solo se sugiere que para zonas con cocirculación de flavivirus se empleen valores de corte cercanos al 100% de reducción de placas, a fin de minimizar falsos resultados producidos por reacciones cruzadas (Roehrig, *et al.*, 2008). El criterio de elección del valor de corte empleado en la presente investigación (80% de reducción de placas) obedece a la adecuación del valor de 0,7 ILN (aceptado por la OMS como correlato serológico de protección) (Mason, *et al.*, 1973; WHO, 2013) en la prueba de PRNT.

El diagnóstico confirmatorio de la enfermedad adquirida de forma natural requiere demostrar el incremento cuádruple en la seroconversión de anticuerpos neutralizantes entre muestras pareadas (OPS/OMS, 2018); tomando en cuenta esta referencia, ciertos investigadores, a pesar de la aceptación generalizada de que una seroconversión con título de anticuerpos neutralizantes mayor o igual a 1:10 es

indicadora de protección contra la enfermedad (Freestone, et al., 1977; Julander, et al., 2011), consideran la seroconversión efectiva de anticuerpos neutralizantes vacunales cuando se consigue un incremento cuádruple sobre el título basal pre vacunación (Hepburn, et al., 2006; Kay, et al., 2011), a fin de garantizar la protección contra la enfermedad. El segundo hallazgo de la presente investigación fue que el 96,7% (29/30) de los participantes evaluados mostró este incremento cuádruple en el día 10 posvacunación, mientras que el 3,3% (1/30) no consiguió dicho incremento, alcanzando solo un título de anticuerpos neutralizantes de 1:14 mediante la prueba de PRNT₈₀ (Tabla 7). El bajo título de anticuerpos neutralizantes hallado en el día 10 posvacunación fue ligeramente superior al límite que establece protección contra la enfermedad, sugiriendo la existencia de una proporción de la población que puede presentar bajos títulos de anticuerpos neutralizantes contra FA, o que incluso podría no encontrarse protegida en el día 10 posvacunación.

En el día 40 posvacunación, el 100% (30/30) de los participantes seroconvirtió con un incremento cuádruple en el título de anticuerpos neutralizantes, mostrando valores significativamente mayores que los obtenidos en el día 10 posvacunación ($p < 0,001$), como se observa en la Figura 2. Este hallazgo respalda la información disponible sobre la cinética de la seroconversión de anticuerpos neutralizantes que indica que los títulos incrementan con el transcurso del tiempo (Pulendran 2009; Monath, et al., 2013; Kongsgaard, et al., 2017) y muestra, que para el día 40 posvacunación, todas las personas evaluadas aseguraron títulos de anticuerpos neutralizantes altos, incluso, las que presentaron títulos de anticuerpos bajos en el día 10 posvacunación.

Existen factores, extrínsecos a los participantes evaluados, que podrían afectar los valores de los títulos de anticuerpos neutralizantes; éstos involucran principalmente a insuficiencias en la conservación de la vacuna hasta el momento de vacunación. Los participantes evaluados se vacunaron independientemente en centros de salud autorizados para administrar gratuitamente vacunas contra la FA, por lo cual se

desconoce si existió alguna falla, en el almacenamiento o ruptura de la cadena de frío durante el transporte de las vacunas, que pueda repercutir sobre su inmunogenicidad. Las vacunas producidas contienen dosis mucho mayores a la dosis mínima requerida por la OMS para la inmunización contra la FA (Monath, *et al.*, 2013; Barrett, 2017; Chen & Hamer, 2017) con lo cual se supera las pérdidas de viabilidad, sin embargo, existe la evidencia de que estudios controlados ofrecen mayores porcentajes de seroconversión respecto a estudios que evalúan seroconversión en personas (militares) vacunadas rutinariamente (Collaborative group for studies on yellow fever vaccines, 2014), lo cual puede estar relacionado a las insuficiencias mencionadas, por tanto, la influencia de este factor extrínseco sobre las alteraciones en la respuesta inmunológica tras la vacunación no puede ser descartada.

Entre los factores intrínsecos que podrían afectar a la respuesta inmunológica, y por consecuencia a los valores de los títulos de anticuerpos neutralizantes, se encuentran la edad (grupos de riesgo como niños y ancianos), sexo, gestación, padecimiento de enfermedades crónicas que predispongan a fallas del sistema inmunológico (diabetes, VIH, hepatitis virales), carga genética, composición de la microbiota intestinal y estado de nutrición (WHO, 2013; Blake & García-Blanco, 2014; Muyanja, *et al.*, 2014; Brodin & Davis, 2017; Lynn & Pulendran, 2018). En la presente investigación se descartaron (por los criterios de selección de muestras) los factores asociados a edad, gestación y enfermedades crónicas que alteren las respuestas del sistema inmunológico; respecto al factor edad, se halló correlación lineal, moderada y directamente proporcional ($\rho_{\text{Spearman}} = + 0,60$ y $p = 0,04$) con los títulos de anticuerpos neutralizantes alcanzados por los varones en el día 40 posvacunación (Figura 4), sin embargo, debido al pequeño rango de edad de los participantes (19 a 37 años, media de 22,7) y al pequeño tamaño de muestra, no se podría asignar significancia a este hallazgo.

Los resultados de la presente investigación muestran que en el día 10 posvacunación no hubo diferencia significativa entre los títulos de anticuerpos neutralizantes

alcanzados por varones y mujeres ($p = 0,220$), sin embargo, en el día 40 posvacunación los títulos fueron significativamente mayores en varones ($p = 0,020$), tal como se mostró en la Tabla 8 y Figura 3. Estos resultados concuerdan con los reportes de investigaciones que muestran títulos de anticuerpos neutralizantes contra FA más altos en varones que en mujeres (Monath, *et al.*, 2002; Niedrig, *et al.*, 2008; Roukens, *et al.*, 2009). Esta diferencia en la respuesta inmunológica se ha reportado también en infecciones con otros agentes patógenos, y se sugiere que podría estar relacionada a la mayor producción de citocinas inducidas por la testosterona en varones (Posma *et al.*, 2004), o a la cinética de la respuesta inmunológica que se manifiesta de forma tardía en las mujeres (Andrés-Terre *et al.*, 2015; Brodin & Davis, 2017). La respuesta inmunológica diferenciada en varones y mujeres tras la vacunación contra FA sigue sin aclararse, por lo cual, los resultados hallados en la presente investigación enriquecerán la información disponible para el entendimiento de esta respuesta diferenciada.

Las limitaciones más importantes de la presente investigación fueron el tipo de muestreo realizado y el tamaño de muestras evaluada; a pesar de estas limitaciones, es importante considerar los hallazgos como parte de una exploración primaria que muestra la necesidad de realizar más investigaciones que permitan obtener datos representativos de la población peruana vacunada contra la FA, y que abarquen la evaluación de factores que podrían afectar la respuesta inmunológica, a fin de actualizar la información disponible y evaluar la efectividad de la principal estrategia del estado frente a la enfermedad de FA, ya que esta estrategia no sería efectiva mientras no se subsanen factores que podrían existir y ser responsables de las alteraciones en la respuesta inmunológica de ciertos sectores de nuestra población.

VIII. CONCLUSIONES

- La evaluación de la seroconversión en el día 10 posvacunación muestra que el 100% los participantes seroconvierte con títulos protectores de anticuerpos neutralizantes mayores a 1:10, de los cuales solo el 96,7% muestra títulos con incremento mayor o igual a 4 veces el título basal de anticuerpos neutralizantes contra esta enfermedad.
- La evaluación de la seroconversión en el día 40 posvacunación muestra que el 100% los participantes seroconvierte con títulos protectores de anticuerpos neutralizantes mayores a 1:10 y con incremento mayor al cuádruple sobre el título basal de anticuerpos neutralizantes contra la fiebre amarilla.
- Se determinó los títulos de anticuerpos neutralizantes contra la fiebre amarilla mediante PRNT₈₀, hallando que el menor título se obtuvo en el día 10 posvacunación, siendo 1:14, y el mayor título se obtuvo en el día 40 posvacunación, siendo 1:32 750.
- Los títulos de anticuerpos neutralizantes contra la fiebre amarilla en el día 40 posvacunación, presentan significancia estadística con relación al sexo.

IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda la evaluación de la pureza, a nivel molecular, de la cepa vacunal 17D-204 empleada en la presente investigación.

Se debe continuar con el seguimiento al nivel de protección de los participantes contra la fiebre amarilla, mediante la evaluación de muestras de suero a partir del año posvacunación, a fin de estimar el curso de la seroconversión y duración de la seroprotección.

Se recomienda diseñar investigaciones que evalúen una muestra representativa y probabilística de la población objetivo, que abarque la evaluación de factores asociados a la respuesta inmunológica de seroconversión.

Finalmente, se recomienda que las investigaciones futuras incluyan a grupos con antecedentes epidemiológicos de enfermedad o vacunación contra otros flavivirus, a fin de determinar la influencia de reacciones cruzadas en la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos neutralizantes contra FA.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACUÑA, M., CASTILLO, R. & GARCÍA, M. Neutralización por reducción en placas como método específico para el diagnóstico serológico de fiebre amarilla. *Revista de Medicina Experimental*. 2001, vol. 18, nº. 4, p. 71-76.
2. ANDRE-TERRE, M., McGUIRE, H., POULIOT, Y., BONGEN, E., SWEENEY, T., TATO, C., & KHATRI, P. Integrated, multi-cohort analysis identifies conserved transcriptional signatures across multiple respiratory viruses. *Immunity*. 2015, vol. 43, nº. 6, p. 1199-1211.
3. BAE, H.G., NITSCHKE, A., TEICHMANN, A., BIEL, S. S., & NIEDRIG, M. Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *Journal of Virological Methods*. 2003, vol. 110, nº. 2, p. 185-191.
4. BARBAN, V., GIRED, Y., AGUIRRE, M., GULIA, S., PÉTIARD, F., RIOU, P., BARRERE, B., LANG, J. High stability of yellow fever 17D-204 vaccine: A 12-year retrospective analysis of large-scale production. *Vaccine*. 2007, vol. 25, nº. 15, p. 2941-2950.
5. BARNETT, E. D. Yellow Fever: Epidemiology and Prevention. *Clinical Infection Diseases*. 2007, vol. 44, nº. 6, p. 850-856.
6. BARRETT, A. D. Yellow Fever Vaccines. *Biologicals*. 1997, vol. 25, nº. 1, p. 17-25.
7. BARRETT, A. D. & MONATH, T. P. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. En: Chambers, T. J. & Monath, T. P. (edits.). *Advances in Virus Research. The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development*. California: Elsevier, 2003, p. 291-315.
8. BARRETT, A. D. & TEUWEN, D. E. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place?. *Current Opinion in Immunology*. 2009, vol. 21, nº. 3, p. 308-313.

9. BARRETT, A. D. Yellow fever live attenuated vaccine: A very successful live attenuated vaccine but still we have problems controlling the disease. *Vaccine*. 2017, vol. 35, nº. 44, p. 5951-5955.
10. BECK, A. S. & BARRETT, A. D. Current status and future prospects of yellow fever vaccines. *Expert Reviews Vaccines*. 2015, vol. 14, nº. 11, p. 1479-1492.
11. BELMUSTO-WORN, V. E., SANCHEZ, J. L., MCCARTHY, K., NICHOLS, R., BAUTISTA, C. T., MAGILI, A. J., PASTOR-CAUNA, G., ECHEVARRIA, C., LAGUNA-TORRES, V. A., SAMAME, B. K., BALDEON, M. E., BURANS, J. P., OLSON, J. G. Randomized, double-blind, phase II, pivotal field trial of the comparative immunogenicity, safety, and tolerability of two yellow fever 17D vaccines (ARLVAXTM and YF-VAX) in healthy infants and children in Perú. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005, vol. 77, nº. 2, p. 189-197.
12. BLAKE, L. E. & GARCÍA-BLANCO, M. A. Human Genetic Variation and Yellow Fever Mortality during 19th Century U.S. Epidemics. *mBio*. 2014, vol. 5, nº. 3, p. e01253-14.
13. BRENT, S. E., WATTS, A., CETRON, M., GERMAN, M., KRAEMER, M. U.G., BOGOCH, I. I., BRADY, O. J., HAY, S. I., CREATORE, M. I., KHAN, K. International travel between global urban centres vulnerable to yellow fever transmission. *Bulletin World Health Organization*. 2018, vol. 96, nº. 5, p. 343-354B.
14. BRODIN, P. & DAVIS, M. M. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol*. 2017, vol. 17, nº. 1, p. 21-29.
15. BROWN, K., DECOFFE, D., MOLCAN, E. & GIBSON, D. L. Diet-Induced Dysbiosis of the Intestinal Microbiota and the Effects on Immunity and Disease. *Nutrients*. 2012, vol. 4, nº. 8, p. 1095-1119.

16. BRYANT, J. E. & BARRETT, A. D. Comparative phylogenies of yellow fever isolates from Perú and Brazil. *Immunology and Medical Microbiology*. 2003, vol. 39, nº. 2, p. 103-118.
17. BRYANT, J., WANG, H., CABEZAS, C., RAMIREZ, G., WATTS, D., RUSSELL, K., & BARRETT, A. Enzootic Transmission of Yellow Fever Virus in Perú. *Emerging Infectious Diseases*. 2003, vol. 9, nº. 8, p. 926-933.
18. BRYANT, J. E., HOLMES, E. C. & BARRETT, A. D. Out of África: A Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. *PLoS Pathogens*. 2007, vol. 3, nº. 5, p. 668-673.
19. CALISHER, C. H., KARABATSOS, N., DALRYMPLE, J. M., SHOPE, R. E., PORTERFIELD, J. S., WESTAWAY, E. G., & BRANDT, W. E. Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determinated by Cross-neutralization Test with Policlonal Antisera. *Journal of General Virology*. 1989, vol. 70, nº. 1, p. 37-43.
20. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Yellow Fever: History, Epidemiology and Vaccination Information* [en línea]. Atlanta, GA: US Departament of Health and Human Services, CDC. 2010 [Citado 08-08-2018]. Disponible en <<https://www.cdc.gov/travel-training/local/HistoryEpidemiologyandVaccination/index.html>>
21. COFFEY, L., VASILAKIS, N., BRAULT, A., POWERS, A., TRIPLET, F., & WEAVER, S. Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, vol. 105, nº. 19, p. 6980-6975.
22. COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES ON YELLOW FEVER VACCINES. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine*. 2014, vol. 32, nº 39, p. 4977-4984.
23. COMITÉ DE INFECCIONES EMERGENTES. Fiebre Amarilla. *Revista Chilena de Infectología*. 2001, vol. 18, nº. 1, p. 64-68.

24. COURTOIS, G. *Time of appearance and duration of immunity conferred by 17D vaccine*. Geneva, Switzerland: WHO Series - Yellow fever vaccine, 1956.
25. CUTOLO, M., SULLI, A., CAPELLINO, S., VILLAGGIO, B., MONTAGNA, P., SERIOLO, B., & STRAUB, R. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*. 2004, vol. 13, nº. 9, p. 635-638.
26. CHEN, L. H. & HAMER, D. H. Vaccination Challenges in Confronting the Resurgent Threat From Yellow Fever. *Journal American Medical Association*. 2017, vol. 318, nº. 17, p. 1651-1652.
27. CHOWDHURY, P. R., MEIER, C., LARAWAY, H., TANG, Y., HODGSON, A., SOW, S. O., ENWERE, G. C., PLIKAYTIS, B. D., KULKARNI, P. S., PREZIOSI, M. P., NIEDRIG, M. Immunogenicity of yellow fever vaccine coadministered with MenAfriVac in healthy infants in Ghana and Mali. *Clinical Infectious Diseases*. 2015, vol. 61, nº. 5, p. S586-S593.
28. DEMADRID, A. T. & PORTERFIELD, J. S. A Simple Micro-culture Method for the Study of Group B Arboviruses. *Bulletin World Health Organization*. 1969, vol. 40, nº. 1, p. 113-121.
29. DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA (DGE). *Sala de Situación de Salud Perú. Semana Epidemiológica Nº 14 - 2017*. [en línea]. MINSA, 2017. [Citado 09-08-2018] Disponible en <<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2017/salaSE14.pdf>>
30. DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA (DGE). *Sala Situacional de Salud Perú. Semana Epidemiológica Nº 52 - 2017*. [en línea]. MINSA, 2017. [Citado 16-09-2018]. Disponible en <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2017/SE52/f_amarilla.pdf>

31. DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA (DGE). *Sala de Situación de Salud Perú. Semana Epidemiológica N° 30 - 2018*. [en línea]. MINSA, 2018. [Citado 09-08-2018]. Disponible en <<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2018/salaSE30.pdf>>
32. DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA (DGE). *Sala de situación de Salud Perú. Semana Epidemiológica N° 34 - 2018*. [en línea]. MINSA, 2018. [Citado 13-09-2018]. Disponible en <<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2018/salaSE34.pdf>>
33. DIRECCIÓN GENERAL DE INTERVENCIONES ESTRATÉGICAS EN SALUD PÚBLICA (DGIESP). *Protocolo sanitario de urgencia para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con fiebre amarilla*. 2016. 1° Edición ed. Lima, Perú: MINSA, 2017.
34. DIRECCIÓN GENERAL DE INTERVENCIONES ESTRATÉGICAS EN SALUD PÚBLICA (DGIESP). *Situación de las inmunizaciones en el Perú: Normatividad, cobertura, meta, indicadores y financiamiento*. [en línea]. MINSA, 2018. [Citado 07-11-2018]. Disponible en <ftp://ftp.minsa.gob.pe/sismed/ftp_carga/reunion%20fortalecimiento%20sismed%20en%20el%20marco%20de%20las%20estrategias%20del%2012%20al%2015%20marzo%202018/reunion%20tecnica%2012%2015%20marzo%202018/reunion%20del%2012_15_03_18/dia%201/inmunizaciones.pdf>
35. ERICKSON, A. K. & PFEIFFER, J. K. Dynamic Viral Dissemination in Mice Infected with Yellow Fever Virus Strain 17D. *Journal of Virology*. 2013, vol. 87, n°. 22, p. 12392-12397.
36. ESPINOZA, M., CABEZAS, C. & RUIZ, J. Un acercamiento al conocimiento de la fiebre amarilla en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental en Salud Pública*. 2005, vol. 22, n°. 4, p. 308-315.

37. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). *Yellow fever among travellers returning from South America*. Stockholm: ECDC, March 2017. [Citado 09-08-2018]. Disponible en <<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/14-03-2017-RRA-Yellow%20fever,%20Flaviviridae-Suriname,%20Southern%20America.pdf>>
38. FORRESTER, N. L., GUERBOIS, M., SEYMOUR, R. L., SPRATT, H., & WEAVER, S. C. Vector-Borne Transmission Imposes a Severe Bottleneck on an RNA Virus Population. *PLOS Pathogens*. 2012, vol. 8, nº. 9, p. e1002897.
39. FREESTONE, D. S., FERRIS, R. D., WEINBERG, A. L. & KELLY, A. Stabilized 17D strain yellow fever vaccine: dose response studies, clinical reactions and effects on hepatic function. *Journal of Biological Standardization*. 1977, vol. 5, nº. 3, p. 181-186.
40. FURMAN, D., HEJBLUM, B. P., SIMON, N., JOJIC, V., DEKKER, C. L., THIÉBAUT, R., TIBSHIRANI, R. J., DAVIS, M. M. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014, vol. 111, nº. 2, p. 869-874.
41. GERSHMAN, M. D. & STAPLES, J. E. Infectious Diseases Related to Travel: Yellow Fever. En: CDC. *Health Information for International Travel (Yellow Book 2018)*. New York: Oxford University, 2017.
42. GIBNEY, K. B., EDUPUGANTI, S., PANELLA, A. J., KOSOY, O. I., DELOREY, M. J., LANCIOTTI, R. S., MULLIGAN, M. J., FISCHER, M., STAPLES, J. E. Detection of anti-Yellow Fever Virus Immunoglobulin M Antibodies at 3 - 4 Years Following Yellow Fever Vaccination. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012, vol. 87, nº. 6, p. 1112-1115.

43. GÓMEZ, S. Y. & OCAZIO, R. E. Anticuerpos Neutralizantes contra el Virus de la Fiebre Amarilla 17D en Colombianos Vacunados y no Vacunados con Inmunidad a Dengue. *Rev. Salud Pública (Bogotá)*. 2008, vol. 10, nº. 5, p. 796-807.
44. GOTUZZO, E., YACTAYO, S. & CORDOVA, E. Review Article: Efficacy and Duration of Immunity after Yellow Fever Vaccination: Systematic Review on the Need for a Booster Every 10 Years. *American journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013, vol. 89, nº. 30, p. 434-444.
45. GOULD, E. & HIGGS, S. Impact of climate change and other factor on emerging arbovirus diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene*. 2009, vol. 103, nº. 2, p. 109-121.
46. GRAJEDA, P. F., ROJAS, C. R., FARFÁN, H., HUAMÁN, K., QUISPE, O., & HUARANCA, M. Evaluación de cobertura y del nivel de información en la campaña de vacunación contra la fiebre amarilla, Cusco, Perú, 2005. *Acta Médica Peruana*. 2008, vol. 25, nº. 2, p. 63-67.
47. GRAY, D. & MATZINGER, P. T Cell Memory Is Short-lived in the Absence of Antigen. *Journal of Experimental Medicine*. 1991, vol. 174, nº. 5, p. 969-974.
48. GROBBELAAR, A., WEYER, J., MOOLLA, N., VUREN, P. J., MOISES, F., & PAWESKA, J. Resurgence of Yellow Fever in Angola, 2015-2016. *Emerging Infectious Diseases*. 2016, vol. 22, nº. 10, p. 1854-1855.
49. GUBLER, D. J. Potential yellow fever epidemics in unexposed populations. *Bulletin World Health Organization*. 2018, vol. 96, nº. 5, p. 299.
50. HAMER, D. H., ANGELO, K., CAUMES, E., VAN GENDEREN, P., FLORESCU, S. A., POPESCU, C. P., PERRER, C., MCBRIDE, A., CHECKLEY, A., RYAN, J., CETRON, M., SCHLAGENHAUF, P. Fatal Yellow Fever in Travelers to Brazil, 2018. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2018, vol. 67, nº. 11, p. 340-341.

51. HEPBURN, M. J., KORTEPETER, M. G., PITTMAN, P. R., BOUDREAU, E. F., MANGIAFICO, J. A., BUCK, P. A., NORRIS, S. L., ANDERSON, E. L. Neutralizing antibody response to booster vaccination with the 17D yellow fever vaccine. *Vaccine*. 2006, vol. 24, nº. 15, p. 2843-2849.
52. HILL, A. B., MÜLLBACHER, A., PARRISH, C., COIA, G., WESTAWAY, E., & BLANDEN, R. Broad cross-reactivity with marked fine specificity in the cytotoxic T cell response to flaviviruses. *Journal of General Virology*. 1992, vol. 73, nº. 5, p. 1115-1123.
53. HOLMES, E. & TWIDDY, S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, genetics and evolution: journal of epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2003, vol. 3, nº. 1, p. 19-28.
54. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA E INFORMÁTICA (INEI). *Desnutrición crónica afectó al 12,9% de la población menor de cinco años de edad en el año 2017*. [en línea]. INEI, 2018. [Citado 16-09-2018]. Disponible en <<https://www.inei.gob.pe/prensa/noticias/desnutricion-cronica-afecto-al-129-de-la-poblacion-menor-de-cinco-anos-de-edad-en-el-ano-2017-10773/>>
55. INTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ (IPK). *Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y la caracterización de los virus del dengue*. La Habana, Cuba: MINISTERIO DE SALUD. 2013.
56. JENKINS, G. M., RAMBAUT, A., PYBUS, O. G. & HOLMES, E. C. Rates of Molecular Evolution in RNA Viruses: A Quantitative Phylogenetic Analysis. *Journal of Molecular Evolution*. 2002, vol. 54, nº. 2, p. 156-165.
57. JENTES, E. S., POUMEROL, G., GERSHMAN, M. D., HILL, D. R., LEMARCHAND, J., LEWIS, R. F., STAPLES, J. E., TOMORI, O., WILDER-SMITH, A., MONATH, T. P. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *Lancet Infectious Disease*. 2011, vol. 11, nº. 8, p. 622-632.

58. JOHANSSON, M. A., VASCONCELOS, P. F. & STAPLES, J. E. the whole iceberg: estimating the incidence of yellow fever virus infection from the number of severe cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014, vol. 108, n° 8, p. 482-487.
59. JONKER, E. F., VISSER, L. G. & ROUKENS, A. H. Advances and controversies in yellow fever vaccination. *Ther Adv Vaccines.* 2013, vol. 1, n° 4, p. 144-152.
60. JULANDER, J. G., TRENT, D. W. & MONATH, T. P. Immune correlates of protection against yellow fever determined by passive immunization and challenge in the hamster model. *Vaccine.* 2011, vol. 29, n° 35, p. 6008-6016.
61. KAU, A. L., AHERN, P. P., GRIFFIN, N. W., GOODMAN, A. L., & GORDON, J. I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature.* 2011, vol. 474, n° 7351, p. 327-336.
62. KAY, A., CHEN, L. H., SISTI, M. & MONATH, T. P. Short Report: Yellow Fever Vaccine Seroconversion in Travelers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2011, vol. 85, n° 4, p. 748-749.
63. KONGSGAARD, M., BASSI, M. R., RASMUSSEN, M., SKJODT, K., THYBO, S., GABRIEL, M., HANSEN, M. B., CHRISTENSEN, J. P., THOMSEN, A. R., BUSS, S., STRYHN, A. Adaptive immune responses to booster vaccination against yellow fever virus are much reduced compared to those after primary vaccination. *Scientific Reports.* 2017, vol. 7, n° 1, p. 662.
64. LANG, J., ZUCKERMEN, J., CLARKE, P., BARRETT, P., KIRKPATRICK, C., & BLONDEAU, C. Comparison of the Immunogenicity and Safety of Two 17D Yellow Fever Vaccines. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1999, vol. 60, n° 6, p. 1045-1050.
65. LIANG, H., LEE, M. & JIN, X. Guiding dengue vaccine development using knowledge gained from the success of the yellow fever vaccine. *Cellular & Molecular Immunology.* 2016, vol. 13, n° 1, p. 36-46.

66. LYNN, D. J. & PULENDRAN, B. The potential of the microbiota to influence vaccine responses. *Journal of Leukocyte Biology*. 2018, vol. 103, nº. 2, p. 225-231.
67. MASON, R. A., TAURASO, N. M., SPERTZEI, R. O. & GINN, R. K. Yellow Fever Vaccine: Direct Challenge of Monkeys Given Graded Doses of 17D Vaccine. *Applied Microbiology*. 1973, vol. 25, nº. 4, p. 539-544.
68. McMAHON, A. W., EIDEX, R. B., MARTIN, A. A., RUSSELL, M., SEJVAR, J. J., MARKOFF, L., HAYES, E. B., CHEN, R. T., BALL, R., BRAUN, M. M., CETRON, M. & THE YELLOW FEVER WORKING GROUP. Neurologic disease associated with 17D-204 yellow fever vaccination: A report of 15 cases. *Vaccine*. 2007, vol. 25, nº. 10, p. 1727-1734.
69. MERCIER-DELARUE, S., DURIER, C., COLIN DE VERDIÈRE, N., POVEDA, J. D., MEIFFRÈDY, V., FERNANDEZ GARCÍA, M. D., LASTÈRE, S., CÉSAIRE, R., MANUGGERA, J. C., MOLINA, J. M., AMARA, A., SIMON, F. Screening test for neutralizing antibodies against yellow fever virus, based on a flavivirus pseudotype. *PLoS One*. 2017, vol. 12, nº. 5, p. e0177882.
70. MILLER, B., MONATH, T., TABACHNICK, W. & EZIKE, V. Epidemic yellow fever caused by an incompetent mosquito vector. *Tropical Medicine and Parasitology*. 1989, vol. 40, nº. 4, p. 396-399.
71. MILLION, M., DIALLO, A. & RAOULT, D. Gut microbiota and malnutrition. *Microbial Pathogenesis*. 2017, vol. 106, p. 127-138.
72. MINISTERIO DE SALUD (MINSA). *Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Arbovirus*. Serie de: Normas Técnicas. Nº 16 ed. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 1996.
73. MINISTERIO DE SALUD. Norma Técnica de Salud que establece el esquema nacional de vacunación. Nº 080 V.02. Perú: MINSA, 2011.

74. MIYAJI, K. T.; AVELINO-SILVA, V. L.; SIMOES, M.; DA SILVA FREIRE, M.; DE MADEIROS, C.R.; BRAGA, P. E.; NEVES, M. A.; LOPES, M. H.; KALLAS, E. G.; SARTORI, A. M. Prevalence and titers of yellow fever virus neutralizing antibodies in previously vaccinated adults. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2016, vol. 59, p. e2.
75. MONATH, T. P. Neutralizing Antibody Responses in the Major Immunoglobulin Classes to Yellow Fever 17D Vaccination of Humans. *American Journal of Epidemiology*. 1971, vol. 93, nº. 2, p. 122-129.
76. MONATH, T. P. Yellow fever: an update. *THE LANCET Infectious Diseases*. 2001, vol. 1, nº. 1, p. 11-20.
77. MONATH, T. P., MCCARTHY, K., BEDFORD, P., JOHNSON, C. T., NICHOLS, R., YOKSAN, S., MARCHESANI, R., KNAUBER, M., WELLS, K. H., ARROYO, J., GUIRAKHOO, F. Clinical proof of principle for ChimeriVax™: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. *Vaccine*. 2002, vol. 20, nº. 7-8, p. 1004-1018.
78. MONATH, T. P., NICHOLS, R., ARCHAMBAULT, W. T., MOORE, L., MARCHESANI, R., TIAN, J., SHOPE, R. E., THOMAS, N., SCHRADER, R., FURBY, D., BEDFORD, P. Comparative safety and immunogenicity of two yellow fever 17D vaccines (ARILVAX and YF-VAX) in a phase III multicenter, double-blind clinical trial. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002, vol. 66, nº. 5, p. 533-541.
79. MONATH, T. P. Yellow Fever Vaccine. *Expert Review Vaccines*. 2005, vol. 4, nº. 4, p. 553-574.
80. MONATH, T. P., GERSHMAN, M., STAPLES, J. E. & BARRETT, A. D. Yellow Fever vaccine. En: S. A. Plotkin, W. Orenstein & P. A. Offit (edit.). *Vaccines*. s.l.:Saunders, 2013. p. 2176-2352.
81. MONATH, T. P. & VASCONCELOS, P. F. Yellow Fever. *Journal of Clinical Virology*. 2015, vol. 64, p. 160-173.

82. MUYANJA, E.; SSEMAGANDA, A.; NGAUV, P.; CUBAS, R.; PERRIN, H.; SRINIVASAN, D.; CANDERAN, G.; LAWSON, B.; KOPYCINSKI, J.; GRAHAM, A. S.; ROWE, D. K.; SMITH, M. J.; ISERN, S.; MICHAEL, S.; SILVESTRI, G.; VANDERFORD T. H., CASTRO E., PANTALEO G., SINGER J., GILLMOUR J., KIWANUKA N., NANVUBYA A., SCHMIDT C., BIRUNGI J., COX J., HADDAD E. K., KALEEBU P., FAST P., SEKALY R. P. & TRAUTMANN L. Immune activation alters cellular and humoral responses to yellow fever 17D vaccine. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014, vol. 124, nº. 7, p. 3147-3158.
83. NIEDRIG, M., LADERMANN, M., EMMERICH, P. & LAFRENTZ, M. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Tropical Medicine and International Health*. 1999, vol. 4, nº. 12, p. 867-871.
84. NIEDRIG M., KÜRSTEINER O., HERZOG C. & SONNENBERG K. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against yellow fever virus. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008, vol 15, nº. 2, p. 177-181.
85. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OPS/OMS). *Comunicación Final de la Organización Panamerica de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) sobre: Investigación de Eventos Adversos Graves en Perú Posteriores a la Vacunación con Vacuna Antiamarílica Elaborada por Bio-Manguinhos, Brasil*. [en línea]. OPS/OMS, 2008. [Citado 17-08-2018]. Disponible en http://www1.paho.org/Spanish/AD/FCH/IM/ComunicacionOPS-OMSFiebreAmarilla_17Mar08.pdf

86. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OPS/OMS). *Diagnóstico por laboratorio de la infección por Virus de la Fiebre Amarilla*. [en línea]. OPS/OMS, 2018. [Citado 16-09-2018]. Disponible en <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=7134&Itemid=40784&lang=es>
87. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). *Serious Events Supposedly Attributable to Vaccination or Immunization Associated with Receipt of Yellow Fever Vaccine During a Mass Immunization Campaign Perú, 2007*. [en línea]. PAHO, 2008. [Citado 17-08-2018] Disponible en <http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2010/YFExpertPanelReport_Mar2008_e%20.pdf>
88. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). *Epidemiological Update Yellow Fever: Situation summary in the Americas*. [en línea]. PAHO, 2017. [Citado 09-08-2018]. Disponible en <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-dec-13-phe-epi-update-yellow-fever.pdf>>
89. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). *Epidemiological Update Yellow Fever: Situation summary in the Americas*. [en línea]. PAHO, 2018. [Citado 09-08-2018] Disponible en <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=43619&lang=en>, 2018
90. PEREIRA, R. C., SILVA, A., SOUZA, M. C., SILVA, M. V., NEVES, P., SILVA, A., MATOS, D., HERRERA, M., YAMAMURA, A., FREIRE, M. S., GASPAR, L. P. & CARIDE, E. An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell cultures. *Vaccine*. 2015, vol. 33, nº. 35, p. 4261-4268.
91. PLOTKIN, S. Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. *Clinical Infectious Diseases*. 2008, vol. 47, nº. 3, p. 401-409.

92. POLAND, J., CALISHER, C., MONATH, T., DOWNS, W., & MURPHY, K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bulletin of the world Organization*. 1981, vol. 59, n°. 6, p. 895-900.
93. POSMA E., MOES H., HEINEMAN M.J. & FAAS M.M. The effect of testosterone on cytokine production in the specific and non-specific immune response. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2004, vol. 52, n°. 4, p. 237-243.
94. PULENDRAN, B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nature Reviews Immunology*. 2009, vol. 9, n°. 10, p. 741-747.
95. QUARESMA, J. A., PAGLIARI, C., MEDEIROS, D. B., DUARTE, M. I., & VASCONCELOS, P. F. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Reviews in Medical Virology*. 2013, vol. 23, n°. 5, p. 305-318.
96. REINHARDT, B., JASPERT, R., NIEDRIG, M., KOSTNER, C., & L'AGE-STEHR, J. Development of Viremia and Humoral and Cellular Parameters of Immune Activation After Vaccination With Yellow Fever virus Strain 17D: A Model of Human Flavivirus Infection. *Journal of Medical Virology*. 1998, vol. 56, n°. 2, p. 159-167.
97. ROEHRIG, J. T., HOMBACH, J. & BARRETT, A. D. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunology*. 2008, vol. 21, n°. 2, p. 123-132.
98. ROUKENS, A. H., VOSSEN, A. C., DISSEL, J. T. V. & VISSER, L. G. Reduced intradermal test dose of yellow fever vaccine induces protective immunity in individuals with egg allergy. *Vaccine*. 2009. vol. 27, n°. 18, p. 2408-2409.

99. ROUKENS, A. H., SOONAWALA, D., JOOSTEN, S. A., DE VISSER, A. W., JIANG, X., DIRKSEN, K., DE GRUIJTER, M., VAN DISSEL, J. T., BREDENBEEK, P. J. & VISSER, L. G.. Elderly Subjects Have a Delayed Antibody Response and Prolonged Viraemia following Yellow Fever Vaccination: A Prospective Controlled Cohort Study. *PLoS ONE*. 2011, vol. 6, nº. 12, p. e277753.
100. SAGE, WORKING GROUP. *Background Paper on Yellow Fever Vaccine*. [en línea]. WHO, Marzo 2013. [Citado 13-09-2018]. Disponible en <http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2013/april/1_Background_Paper_Yellow_Fever_Vaccines.pdf>
101. SALJE, H., RODRÍGUEZ-BARRAQUER, I., RAINWATER-LOVETT, K., NISALAK, A., THAISOMBOONSUK, B., THOMAS, S. J., FERNANDEZ, S., JARMAN, R. G., YOON, I. K. & CUMMINGS, D. Variability in Dengue Titer Estimates from Plaque Reduction Neutralization Test Poses a challenge to Epidemiological Studies and Vaccine Development. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014, vol. 8, nº. 6, p. e2952.
102. SALMONA, M., GAZAIGNE, S., MERCIER-DELARUE, S., GARNIER, F., KORIMBOCUS, J., DE VERDIÈRE, N. C., LEGOFF, J. & ROQUES, P. Molecular characterization of the 17D-204 yellow fever vaccine. *Vaccine*. 2015, vol .33, nº. 41, p. 5432-5436.
103. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. *Recomendações da vacinação contra febre amarela após a declaração da Organização Mundial da Saúde*. [en línea]. CGPNI, 2014. [Citado 14-09-2018] Disponible en <<http://sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2015/02/Nota-Informativa-143-2014-Febre-Amarela.pdf>>
104. SEGURA, L., MONTES, C., HILARIO, E., ASENJO, P., & BALTAZAR, G. *Pobreza y Desnutrición Infantil*. 1º Edición. Lima, Perú: PRISMA ONGD. , 2002.

105. SIMOES, M., CAMACHO, L. A., YAMAMURA, A. M., MIRANDA, E. H., CAJARAVILLE, A. C., & FREIRE, M. D. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies.. *Biologicals*. 2012, vol. 40, nº. 6, p. 399-404.
106. SPECTOR, S. & TAURASO, N. Yellow Fever Virus I. Development and Evaluation of a Plaque Neutralization Test. *Applied Microbiology*. 1968, vol. 16, nº. 11, p. 1770-1775.
107. STAPLES, J. E. & MONATH, T. P. Yellow Fever. En: R. L. Guerrant, D. H. Walker & P. F. Weller, (edits.) *Tropical Infectious Diseases*. New York: Saunders Elsevier, 2011, p. 492-503.
108. SUBRAMANIAN, S., HUQ, S., YATSUNENKO, T., HAQUE, R., MAHFUZ, M., ALAM, M. A., BENEZRA, A., DESTEFANO, J., MEIER, M. F., MUEGGE, B. D., BARRATT, M. J., VANARENDOK, L. G., ZHANG, Q., PROVINCE, M. A., PETRI, W. A., AHMED, T. & GORDON J. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature*. 2014, vol. 510, nº. 7505, p. 417-421.
109. THEILER, M. & SMITH, H. H. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *Journal of Experimental Medicine*. 1937, vol. 65, nº. 6, p. 787-800.
110. THOMAS, S. J., NISALAK, A., ANDERSON, K. B., LIBRATY, D. H., KALAYANAROOJ, S., VAUGHN, D.W., PUTNAK, R., GIBBONS, R. V., JARMAN, R. & ENDY, T. P. Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009, vol. 81, nº. 5, p. 825-833.
111. TILG, H. & MOSCHEN, A. R. Food, Immunity, and the Microbiome. *Gastroenterology*. 2015, vol. 148, nº. 6, p. 1107-1119.

112. VASCONCELOS, P.F.C., COSTA, Z.G., ROSA, DA TRAVASSOS E.S., LUNA, E., RODRIGUES, S.G., BARROS, V.L.R.S., DIAS, J.P., MONTEIRO, H.A.O., OLIVA, O.F.P., VASCONCELOS, H.B., OLIVEIRA, R.C., SOUSA, M.R.S., DA SILVA BARBOSA, J., CRUZ, A.C.R., MARTINS, E.C. & TRAVASSOS, J.F.S. Epidemic of Jungle Yellow Fever in Brazil, 2000: Implications of Climatic Alterations in Disease Spread. *Journal of Medical Virology*. 2001, vol. 65, nº. 3, p. 598-604.
113. WHITTEMBURY, A., RAMIREZ, G., HERNÁNDEZ, H., ROPERO, A. M., WATERMAN, S., TICONA, M., BRINTON, M., UCHUYA, J., GERSHMAN, M., TOLEDO, W., STAPLES, E., CAMPOS, C., MARTÍNEZ, M., CHANG, G. J. & CABEZAS, C. Viscerotropic disease following yellow fever vaccination in Perú. *Vaccine*. 2009, vol. 27, nº. 42, p. 5974-5981.
114. WILDER-SMITH, A. & LEONG, W. Importation of yellow fever into China: assessing travel patterns. *Journal of Travel Medicine*. 2017, vol. 24, nº. 4, p. 1-4.
115. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *International Health Regulations (1969)*, Geneva: World Health Organization, 1983.
116. WORLD HEALTH ORGANIZATION, EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARIZATION. *Requirements for Yellow Fever Vaccine (Requirements for Biological Substances Nº 3) Proposed Amendment*. [en línea]. WHO, 2008. [Citado 13-09-2018] Disponible en <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/yellow_fever/ECBS%202008%20WHO_TRS%20872%20%20Amndmt_Yellow%20Fever.pdf>
117. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Vaccines and vaccination against yellow fever. WHO Position Paper - June 2013. *Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire*. 2013, vol. 88, nº. 27, p. 269-284.

118. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *International travel and health: world-yellow fever vaccination booster*. [en línea]. WHO, 2014. [Citado 14-09-2018] Disponible en <<http://www.who.int/ith/updates/20140605/en>>
119. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Situation Report. Yellow Fever*. [en línea]. WHO, 2016. [Citado 09-09-2018]. Disponible en <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246224/yellowfeversitrep-15Jul16-eng.pdf;jsessionid=8BB4F012DD5FAA17789565BBB5AD719C?sequence=1>>
120. WU, J. T., PEAK, C. M., LEUNG, G. M. & LIPSITCH, M. Fractional dosing of yellow fever vaccine to extend supply: a modelling study. *The Lancet*. 2016, vol. 388, nº. 10062, p. 2904-2911.
121. YGLESIAS-ROSALES, M., RODRÍGUEZ-GONZALES, A. & ROJAS-MONTERO, M. Fiebre amarilla: un peligro latente. *Acta Médica Costarricense*. 2005, vol. 47, nº. 3, p. 118-125.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Formato del Consentimiento Informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA RECOLECCIÓN, USO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE Y DATOS PERSONALES

Título del estudio:

“Evaluación de la seroconversión de anticuerpos neutralizantes mediante la Prueba de Neutralización por Reducción de Placas en personas sanas vacunadas contra Fiebre Amarilla”

Datos del investigador principal:

Nombre :

Lugar de investigación : Laboratorio de Virología Clínica y Molecular-UNMSM

Teléfono :

Correo electrónico :

A. HOJA DE INFORMACIÓN:

Este documento tiene como objeto solicitar su autorización escrita para la donación gratuita de la muestra de sangre, con el fin de utilizarla en investigación científica relacionada a enfermedades ocasionadas por virus que son transmitidos por artrópodos vectores, e incorporar su muestra a un Bio-banco del Laboratorio de Virología Clínica y Molecular, que forma parte de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Es importante que lea detenidamente esta hoja de consentimiento informado, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea preciso acerca de la misma.

1. Finalidad y descripción del proceso de obtención de muestras biológicas.

El propósito de esta investigación es evaluar la seroconversión en personas que van a ser vacunadas contra el virus Fiebre Amarilla (FA), y de esta forma determinar si después de la vacunación presentan anticuerpos neutralizantes contra el virus FA.

Luego de que firme el consentimiento informado, Ud. aceptará donar su muestra para que pueda ser utilizada en la investigación. El tipo de muestra donada será sangre periférica, cuya obtención es en principio un procedimiento exento de riesgo, y sus posibles complicaciones son las mismas que las de cualquier extracción de sangre habitual.

El procedimiento consistirá en obtener 6mL de sangre en 3 momentos (antes de la vacunación y días 10 y 40 posvacunación) a través de la punción en una vena del brazo. Está previsto que su participación dure 40 días, o el tiempo requerido para la obtención de muestras en los tres momentos ya descritos.

2. Carácter altruista de la donación.

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que Ud. no obtendrá ni ahora ni en el futuro algún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarle por los productos desarrollados a partir de esta investigación.

Ud. es libre de retirar su consentimiento para participar en esta investigación en cualquier momento sin que esto lo perjudique; simplemente deberá notificar al investigador de su decisión por escrito.

3. Riesgos.

Los riesgos asociados con la obtención de muestras de sangre de su brazo son el dolor momentáneo y la posibilidad de un hematoma (moretón) en la zona de la extracción.

4. Protección de datos y confidencialidad.

Los datos que lo identifiquen serán tratados en forma confidencial como lo exige la ley. Salvo para quienes estén autorizados a acceder a sus datos personales, Ud. no podrá ser identificado y para ello se le asignará un código.

5. Información sobre resultados del estudio.

Los datos que se obtengan de la muestra serán archivados, y formarán parte del proyecto de investigación, manteniéndose durante el desarrollo del mismo, y como máximo durante un periodo de 2 años. De ser requeridos, los resultados obtenidos se informarán personalmente.

B. CONSENTIMIENTO INFORMADO (HOJA DE FIRMAS):

- ✓ He recibido una explicación satisfactoria sobre el procedimiento del estudio, su finalidad, riesgos, beneficios y alternativas.
- ✓ He quedado satisfecho/a con la información recibida, la he comprendido, se me han respondido todas mis dudas y comprendo que mi participación es voluntaria.
- ✓ Presto mi consentimiento para el uso de mis muestras biológicas en el proyecto de investigación propuesto, y para su uso posterior en investigaciones relacionadas a virus de importancia clínica.
- ✓ Conozco mi derecho a retirar el consentimiento cuando lo desee, con la única obligación de informar mi decisión al investigador principal responsable del estudio.

NOMBRE :

Nº DNI :

FIRMA :

FECHA :

Anexo 2. Composición de los medios de cultivo y soluciones empleados

1. Medio de Crecimiento (MC)

Medio Mínimo Esencial con sales de Earle (E-MEM) (GIBCO)	10,63 g
Aminoácidos no Esenciales 100x (GIBCO)	1 %
Piruvato de Sodio 100x (GIBCO)	1 %
L-Glutamina 100x (GIBCO)	1 %
Antibiótico y Antimicótico 100x (GIBCO)	1 %
Suero Bovino Fetal (SBF) (GIBCO)	10 %
Bicarbonato de Sodio (8%) *	
Buffer Hepes (CDH)	24 mM
Agua Bidestilada	Completar a 1 L

* Adicionar bicarbonato de sodio hasta ajustar el pH a 7,3

Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 y almacenar a 4°C.

2. Medio de Mantenimiento (MM)

Medio Mínimo Esencial con sales de Earle (E-MEM) (GIBCO)	9,526 g
Aminoácidos no Esenciales 100x (GIBCO)	1 %
Piruvato de Sodio 100x (GIBCO)	1 %
L-Glutamina 100x (GIBCO)	1 %
Antibiótico y Antimicótico 100x (GIBCO)	1 %
Suero Bovino Fetal (SBF) (GIBCO)	2 %
Bicarbonato de Sodio (8%) *	
Buffer Hepes (CDH)	24 mM
Agua Bidestilada	Completar a 1 L

* Adicionar bicarbonato de sodio hasta ajustar el pH a 7,3

Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 y almacenar a 4°C.

3. Medio de Recubrimiento

Carboximetilcelulosa al 3% (CMC 3%)

Carboximetilcelulosa (SIGMA) 3 g

Agua Bidestilada 100 mL

Esterilizar por calor húmedo a 121°C, durante 15 minutos y 15 lb.

Medio E-MEM doble concentrado

Medio Mínimo Esencial con sales de Earle (E-MEM) (GIBCO) 19 g

Aminoácidos no Esenciales 100x (GIBCO) 2 %

Piruvato de Sodio 100x (GIBCO) 2 %

L-Glutamina 100x (GIBCO) 1 %

Antibiótico y Antimicótico 100x (GIBCO) 2 %

Suero Bovino Fetal (SBF) (GIBCO) 10 %

Bicarbonato de Sodio (8%) *

Buffer Hepes ** (CDH) 24 mM

Agua Bidestilada Completar a 1 L

Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 y mezclar con CMC al 3% (estéril) en relación 11:5.

* Después de la mezcla, adicionar bicarbonato de sodio hasta ajustar el pH a 7,3

**El buffer Hepes (estéril) debe ser el último componente adicionado.

4. Colorante Azul Negro de Naftol (NBB)

Azul Negro de Naftol (SIGMA) 2 g

Acetato de sodio 13,6 g

Ácido acético glacial 60 mL

Agua destilada Completar a 1 L

No requiere de esterilización; almacenar a temperatura ambiente en frascos oscuros.

5. Tripsina

Tripsina (SIGMA)	0,48 g
------------------	--------

Agua destilada	100 mL
----------------	--------

Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 y almacenar a -20°C.

6. Colorante vital Azul de Tripán

Azul de Tripán (SIGMA)	0,5 g
------------------------	-------

Solución salina (9%)	100 mL
----------------------	--------

No requiere de esterilización; almacenar a temperatura ambiente en frascos oscuros.

Anexo 3. Efecto citopático y titulación del Pasaje 3 de semillas virales en células Vero-76.

El ECP se evidenció en el día 3 posinfección y alcanzó 3+ (equivalente a un 75% de desprendimiento de la monocapa celular) en el día 5 posinfección.

Tabla 9. Título del Pasaje 3 de semillas virales mediante prueba de plaqueo por método semisólido.

	(Dilución) ⁻¹						
	10 ³	5x10 ³	10x10 ³	25x10 ³	50x10 ³	75x10 ³	10 ⁵
Promedio UFP/pozo	INC	INC	INC	INC	10	8	5
% Coeficiente de variación	-	-	-	-	6,3	11,2	12,6
Título viral (UFP/mL)	-	-	-	-	1x10 ⁷	1.2x10 ⁷	1x10 ⁷
Título viral promedio	-	-	-	-	1.07x10⁷ UFP/mL		

INC: Incontable.

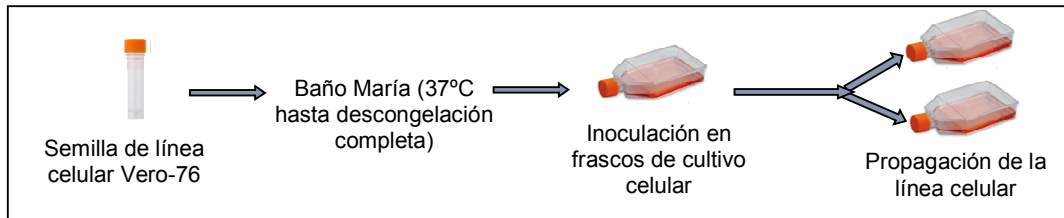
Los coeficientes de variación de los recuentos en una misma dilución fueron en todos los casos menores al 20%.

Anexo 4. Ficha Epidemiológica

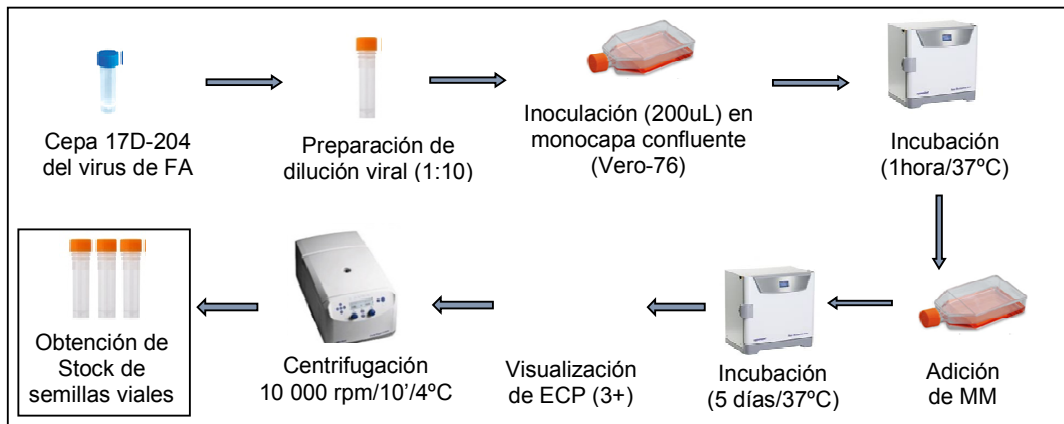
DATOS PERSONALES			
Apellido Paterno	:	Apellido Materno	:
Nombres	:	Sexo	:
Fecha de Nacimiento	:	Lugar de Nacimiento	:
		(País/Departamento/Distrito)	
Domicilio	:	Ocupación	:
ANTECEDENTES DE VACUNACIÓN			
¿Se ha vacunado contra la Fiebre Amarilla?		:	
¿En cuántas oportunidades se ha vacunado contra esta enfermedad?		:	
Fecha de la última vacunación (Según carné de vacunación)		:	
Fecha de la primera vacunación (Según carné de vacunación)		:	
ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS			
Antes de vacunarse ¿Realizó viajes a alguno de los siguientes departamentos?			
San Martín	<input type="checkbox"/>	Puno	<input type="checkbox"/>
Junín	<input type="checkbox"/>	Ayacucho	<input type="checkbox"/>
Amazonas	<input type="checkbox"/>	Huánuco	<input type="checkbox"/>
Loreto	<input type="checkbox"/>	Ucayali	<input type="checkbox"/>
Cusco	<input type="checkbox"/>	Pasco	<input type="checkbox"/>
Madre de Dios	<input type="checkbox"/>	Huancavelica	<input type="checkbox"/>
Antes de vacunarse ¿Fue diagnosticado con alguna de las siguientes enfermedades?			
Dengue	<input type="checkbox"/>	Leptospirosis	<input type="checkbox"/>
Zika	<input type="checkbox"/>	Malaria	<input type="checkbox"/>
Hepatitis A, B o C	<input type="checkbox"/>	Bartonelosis	<input type="checkbox"/>
Antes de vacunarse ¿Realizó viajes al exterior del país? ¿A qué país? _____			

Anexo 5. Flujoigramas.

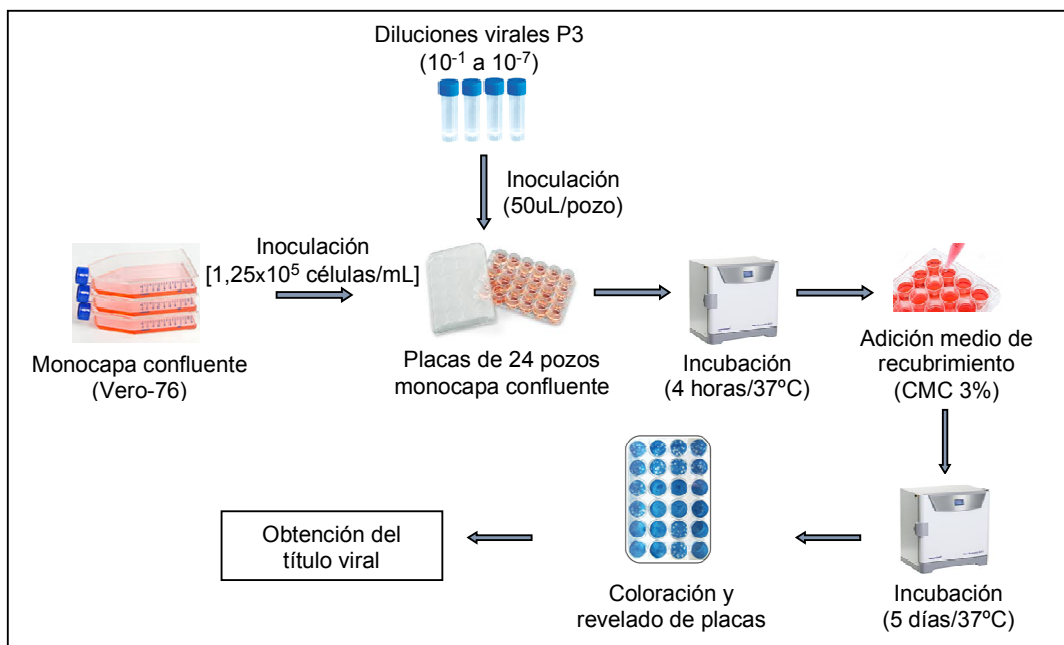
1. Establecimiento de un sistema de cultivos celulares con la línea celular Vero-76



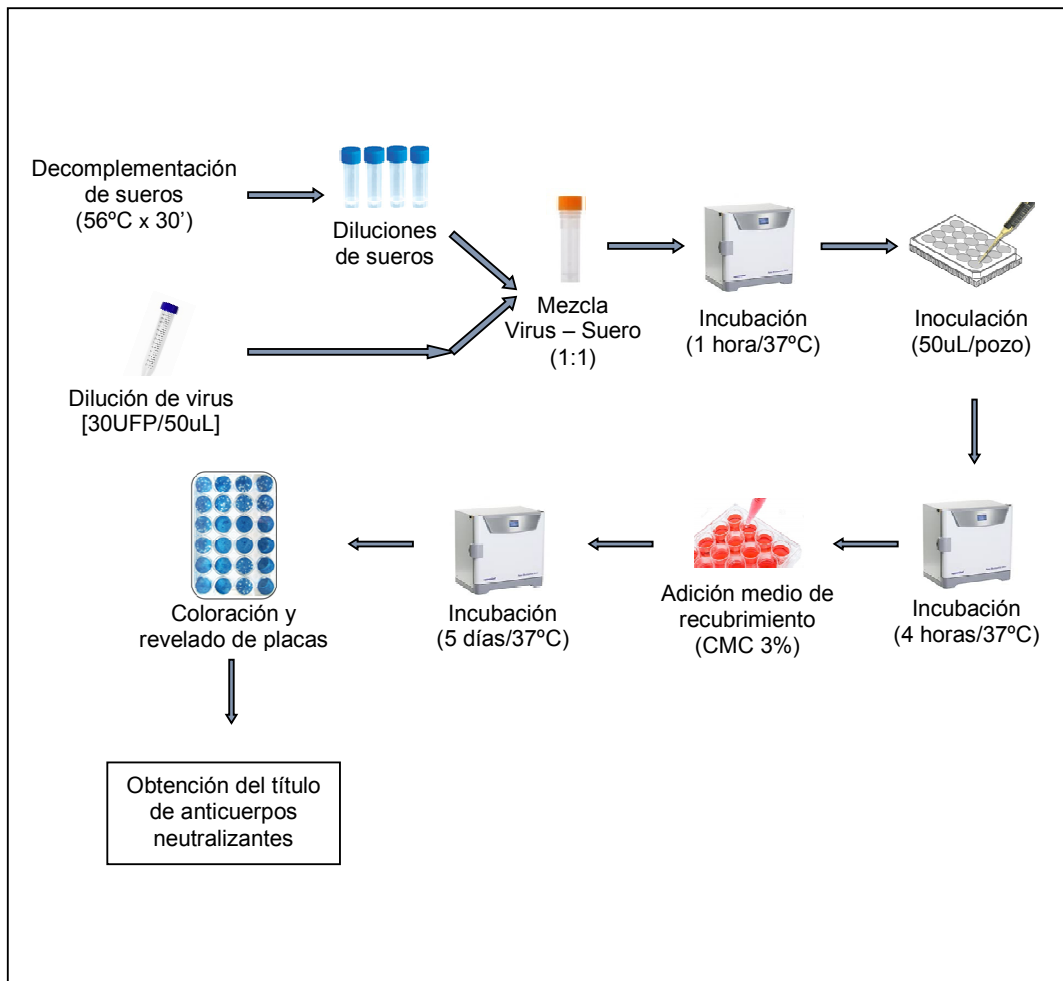
2. Producción de semillas virales



3. Titulación de semilla viral en células Vero-76. Método de recubrimiento semisólido

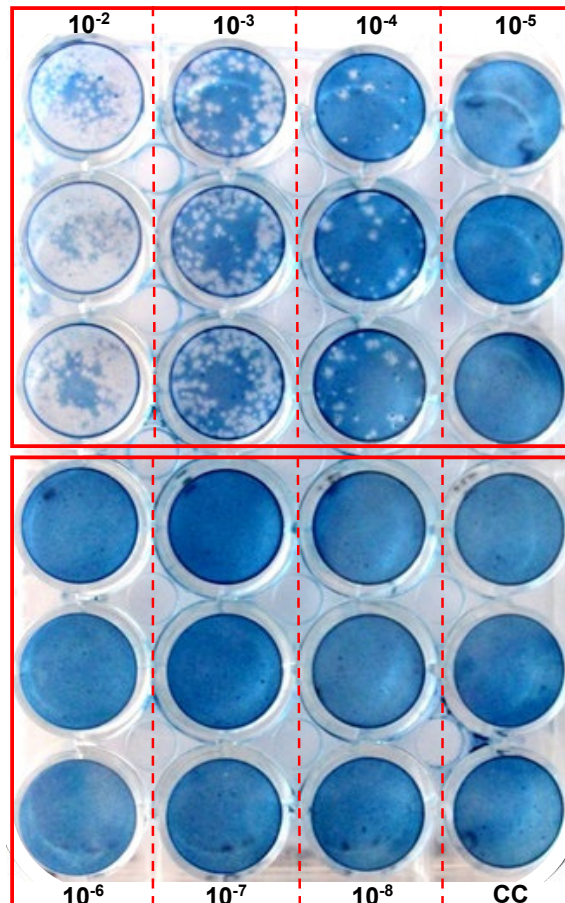


4. Determinación del título de anticuerpos neutralizantes contra FA presentes en muestras obtenidas para evaluación de seroconversión mediante la prueba de PRNT₈₀



Anexo 6. Fotografías

1. Prueba de plaqueo realizada en una placa con la línea celular Vero-76, revelada tras 5 días de incubación con la cepa 17D-204 del virus de FA.

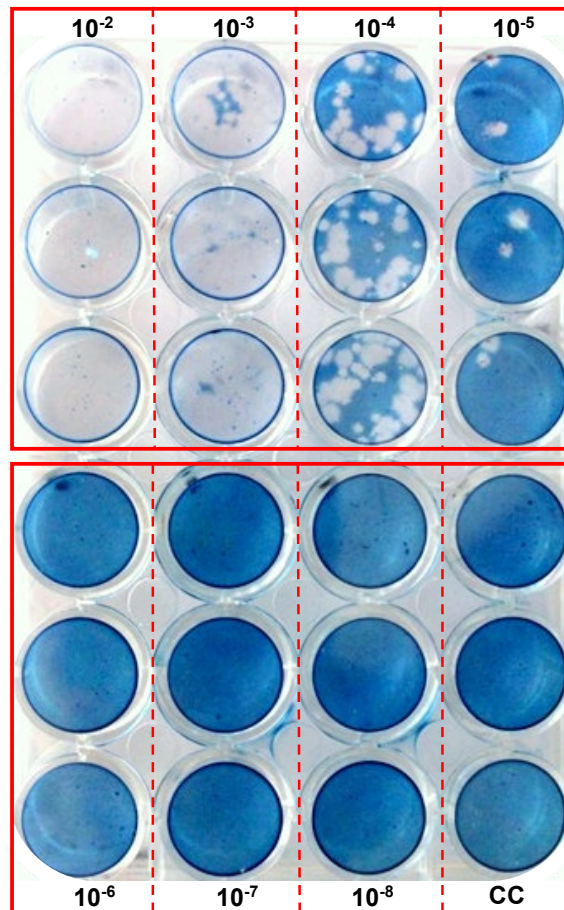


10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} : Diluciones virales

CC : Control de células

No se observa superposición de las placas de lisis formadas en cada pozo. Este momento fue considerado como el día óptimo de revelado de placas.

2. Prueba de plaqueo realizada en una placa con la línea celular Vero-76, revelada tras 6 días de incubación con la cepa 17D-204 del virus de FA.

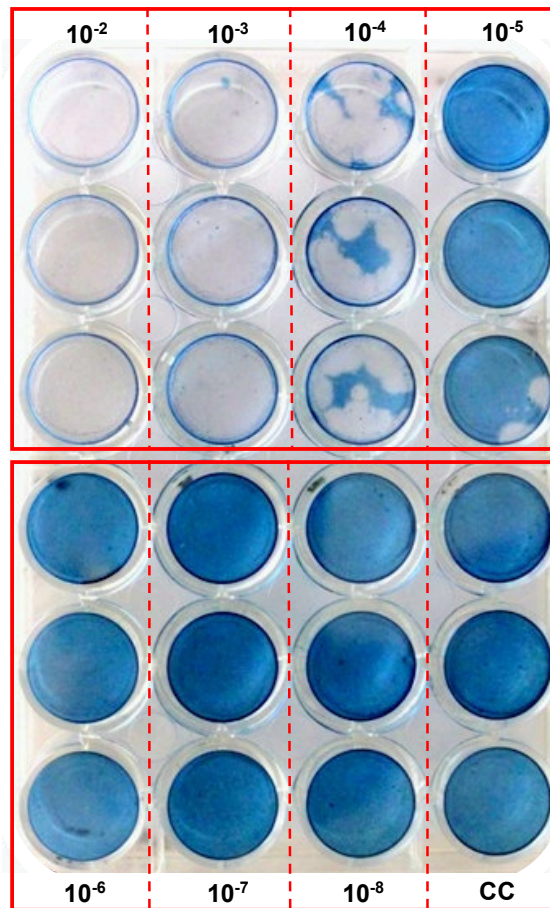


10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} : Diluciones virales

CC : Control de células

Se observa la superposición de las placas de lisis formadas en cada pozo.

3. Prueba de plaqueo realizada en una placa con la línea celular Vero-76, revelada tras 7 días de incubación con la cepa 17D-204 del virus de FA.

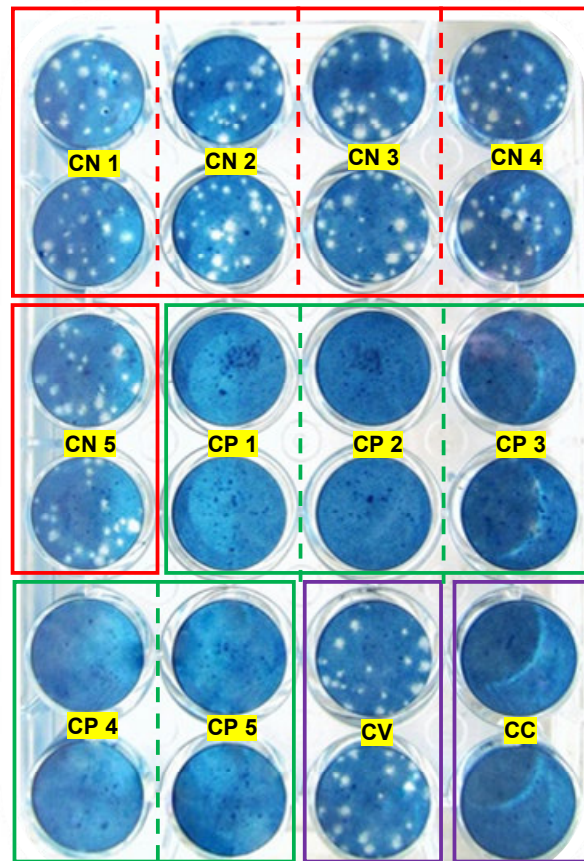


10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} : Diluciones virales

CC : Control de células

Se observa la superposición de las placas de lisis formadas en cada pozo.

4. Prueba de PRNT realizada para la evaluación de controles serológicos positivos y negativos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de FA, en una placa de cultivo con la línea celular Vero-76.



CN1, CN2, CN3, CN4, CN5 : Controles negativos

CP1, CP2, CP3, CP4, CP5 : Controles positivos

CV : Control de virus

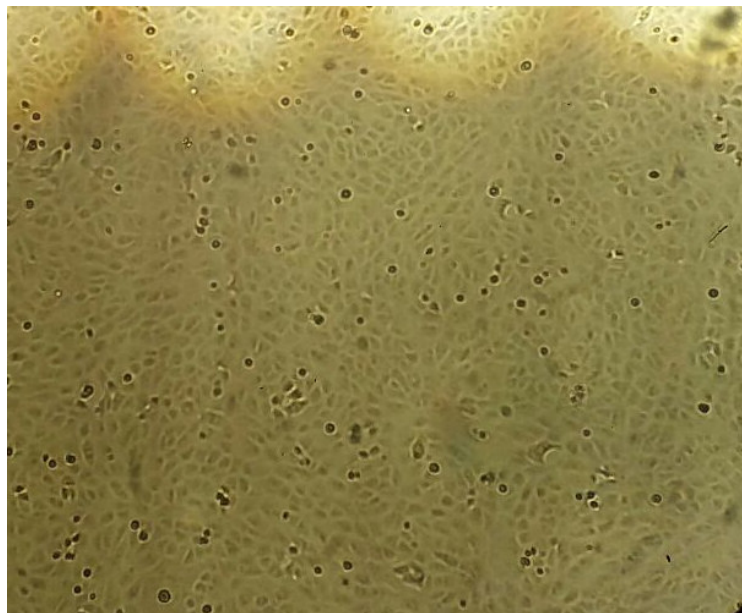
CC : Control de células

Los controles negativos muestran títulos de anticuerpos neutralizantes contra FA menores a 1:10 y los controles positivos muestran títulos de anticuerpos neutralizantes contra FA mayores a 1:10.

5. Vista microscópica de una monocapa confluyente de la línea celular Vero-76.

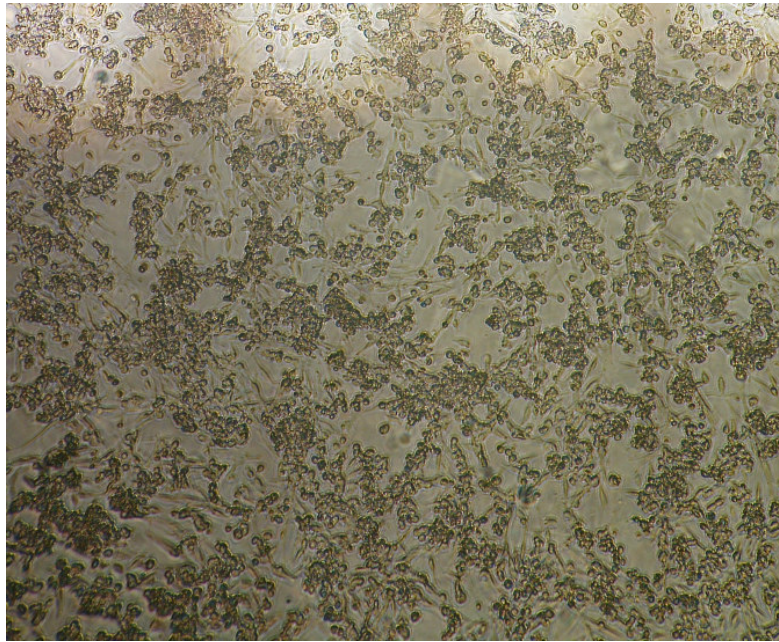


Aumento 40X



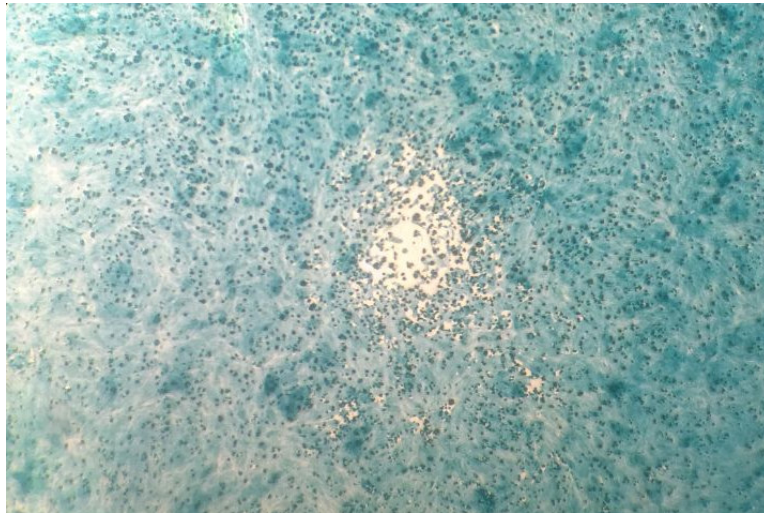
Aumento: 100X

6. Vista microscópica de un efecto citopático de 3+ sobre una monocapa confluyente de la línea celular Vero-76 en el día 5 posinfección con la cepa 17D-204 del virus de FA.

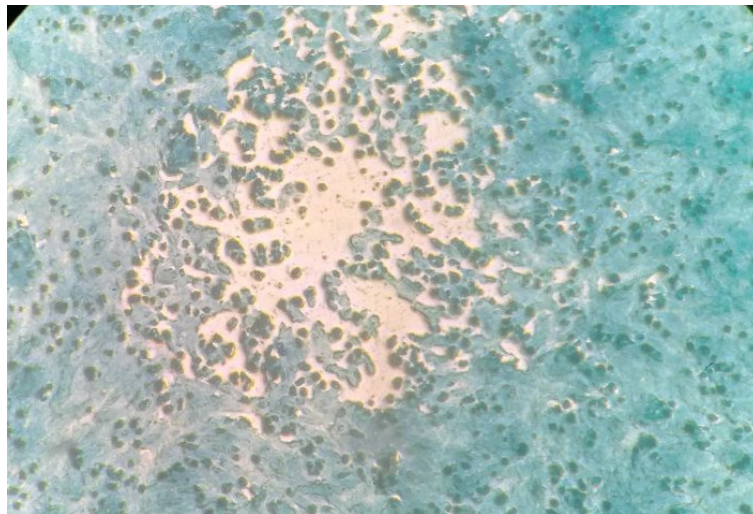


Aumento: 100X

7. Vista microscópica de una placa de lisis en la línea celular Vero-76. Prueba de PRNT revelada tras 5 días de incubación con la cepa 17D-204 del virus de FA.



Aumento: 40X



Aumento: 100X

Anexo 7. Ecuaciones empleadas para realizar la prueba de PRNT.

Ecuación 1. Ecuación para ajuste de concentraciones

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde:

C_1 = Concentración inicial de células

C_2 = Concentración de células requerida

V_1 = Volumen inicial

V_2 = Volumen final requerido

Ecuación 2. Fórmula para el cálculo del título viral.

$$Título\ viral = \frac{(\bar{X}P)}{(V)x(Dilución)}$$

Donde:

$\bar{X}P$ = Promedio de UFP contadas en los pozos de una dilución.

V = Volumen del inóculo expresado en mL.

Dilución = Dilución en la que se contaron las UFP.

Ecuación 3. Fórmula para el cálculo del porcentaje de reducción de UFP.

$$\% Reducción\ de\ UFP = 1 - \frac{100 \times (\bar{p})}{\bar{P}}$$

Donde:

\bar{p} = Promedio de UFP presentes en una dilución de suero evaluada.

\bar{P} = Promedio de UFP presentes en los controles de virus.